

Validación de ensayo de fluorescencia polarizada de progesterona en leche

- Estudio piloto -

Milovan Stojanovic¹, Chris Carter², Milica Kovacevic Filipovic³, Andjelo Beletic⁴,
Adam Suluburic¹, Miladin Kostovic¹

Ellie LLC ha desarrollado un ensayo fluorescencia polarizada (FPA) para la cuantificación de los niveles de progesterona en leche (P4). Para validar el rendimiento analítico de este ensayo, probamos: 1) intra-ensayo, inter-ensayo y precisión entre operadores; 2) estabilidad de almacenamiento de P4 en leche después de refrigerar o congelar muestras durante 24 h; 3) el efecto de agregar dicromato de potasio como conservante sobre la concentración de P4; y 4) el rendimiento del FPA frente a un radioinmunoensayo (RIA) en la determinación de concentración P4 en leche y suero. Además, evaluamos el rendimiento de FPA P4 en leche como una "prueba temprana de no embarazo" durante al menos un ciclo estral en 20 vacas Holstein-Friesian y 14 Jersey. El FPA P4 en leche demostró una fuerte repetibilidad (CV medio total < 5%) y reproducibilidad (CV medio total < 9%). La estabilidad del almacenamiento de la muestra fue aceptable en ambas condiciones de temperatura. La adición de dicromato de potasio no causó variación significativa en las mediciones de P4 FPA. Las concentraciones de P4 en leche, en comparación con los resultados de RIA estaban sesgadas, pero las diferencias no fueron significativas desde el punto de vista diagnóstico. En todos los casos en que se evaluó el rendimiento de la "prueba temprana sin embarazo", el FPA P4 arrojó una especificidad del 100%, cuando se utilizó un valor de corte arbitrario de P4 de 35 ΔmP. Ningún animal se clasificó falsamente como abierto, y estos resultados se verificaron posteriormente utilizando métodos clásicos. El mismo punto de corte también produjo una sensibilidad del 60-100% para las vacas Holstein-Friesian, dependiendo de del uso del ensayo. En vacas Jersey no sincronizadas, la sensibilidad fue del 28-57%. El método de pintura de cola se utilizó para detectar el celo en este grupo, lo que condujo a una IA de menor éxito general en Jerseys. Concluimos que la FPA P4 en leche, es un ensayo diagnóstico rápido y fiable para detectar los niveles de P4 en leche, y en consecuencia calor, estado de embarazo, y algunas condiciones patológicas. Además, el ensayo no requiere un espacio de laboratorio dedicado; se puede ejecutar una granja o en un laboratorio clínico.

Introducción

El ensayo de progesterona láctea (P4) es una herramienta útil para detectar rápidamente el calor que se aproxima en vacas que no concibieron después de la inseminación artificial (IA) y para identificar vacas con celo silencioso (McLeod et al., 1991; McDougall, 2010). Idealmente, un ensayo de P4 en leche debe ser cuantitativo y lo suficientemente simple como para realizarse en la granja (Waldmann y Rod, 2016). Ellie LLC ha desarrollado un ensayo de fluorescencia polarizada (FPA) sensible y específico que cuantifica la concentración de progesterona en leche.

FPA es fácil de realizar, y no requiere múltiples pasos de separado, lo que ayuda a los usuarios finales a evitar potenciales errores analíticos. Con el uso de equipos portátiles, se puede realizar en la granja.

También es un ensayo homogéneo sin una fase sólida, lo que facilita la extracción y detección consistentes de moléculas hidrofóbicas, como la progesterona, en comparación, a ensayos de fase sólida, como ELISA o flujo lateral. La grasa de la leche tiene menos efecto sobre el FPA porque utiliza alcohol como disolvente, lo que también facilita la recuperación de P4. La preparación de la muestra y los resultados se pueden lograr en menos de 10 minutos.

En este informe, presentamos datos preliminares de rendimiento analítico y diagnóstico para el FPA P4 en leche. Para evaluar el rendimiento del ensayo, seguimos las pautas de la Sociedad Americana de Patología Clínica Veterinaria – ASVCP (Flatland et al., 2010) y los Estados Unidos. Administración de Alimentos y Medicamentos – FDA (www.fda.gov). Para determinar el rendimiento analítico de la FPA P4 de leche, probamos la precisión intra-ensayo, inter-ensayo e inter-operador utilizando concentraciones bajas, medias y altas de P4. También probamos la estabilidad del almacenamiento de muestras y el efecto de agregar dicromato de potasio como conservante. Además, comparamos los resultados del FPA y el radioinmunoensayo (RIA) al medir las concentraciones de P4 en la leche.

1. DOO Biotehnika IVD, Kraljevo, Serbia, una división de Ellie LLC

2. Totally Vets Ltd, Fielding, Nueva Zelanda

3. Universidad de Belgrado, Facultad de Medicina Veterinaria, Belgrado, Serbia

4. Centro de Bioquímica Médica, Centro Clínico de Serbia, Belgrado, Serbia

Autor para correspondencia: miladin@ellielab.com

Para evaluar el rendimiento diagnóstico del FPA, correlacionamos las concentraciones de P4 en suero y leche y monitoreamos las fluctuaciones de P4 durante al menos un ciclo de celo en vacas Holstein-Friesian, Jersey y Simmental.

Materiales y métodos

FPA P4 Leche

Las concentraciones de P4 en muestras de leche se midieron con el Kit de ensayo FPA P4 en leche (Lote No. 101) de Ellie LLC que utiliza un lector de fluorescencia polarizada de BioTek® Synergy™ H1 y placas de microtitulación negra de 24 pozos. El ensayo se realizó de acuerdo con el manual del kit. Las pruebas se realizaron en Totally Vets Ltd., una clínica veterinaria en Feilding, Nueva Zelanda y en nuestro laboratorio subsidiario en DOO Biotehnika IVD en Kraljevo, Serbia.

El ensayo FPA P4 es cuantitativo, pero los resultados no representan la concentración absoluta de P4. En cambio, la unidad de medida es Delta mP (ΔmP). ΔmP es directamente proporcional a la concentración de P4 en la leche. Sin embargo, la interpretación de los resultados es cualitativa: si un valor de ΔmP está por debajo del límite, indica un P4 bajo (es decir, una vaca abierta). Si el valor de ΔmP está por encima del punto de corte, indica P4 alto e identifica una vaca potencialmente preñada, o una vaca no preñada con un cuerpo lúteo activo, o un quiste lúteo. En este manuscrito, algunos resultados de validación analítica se presentan como mP (es decir, no convertidos a ΔmP). En estos casos, la relación con la concentración de P4 de la leche es inversa.

Desempeño analítico de la FPA P4 en leche

Para evaluar el rendimiento analítico de la FPA P4 en leche, utilizamos leche de vacas Simmental tomada 30 y 70 días después del parto para obtener muestras con concentraciones bajas y altas de P4, respectivamente. Las muestras con una concentración P4 media se crearon mezclando muestras de leche P4 bajas y altas en una proporción de 1: 1.

La precisión intra-ensayo se determinó mediante la prueba de muestras de leche fresca, mientras que las precisiones inter-ensayos e inter-operadores se determinaron utilizando muestras de leche en alicuotas y congelada. Para determinar la precisión intraensayo, se probó 10 veces, una de concentración baja, 1 media y 1 alta. Para determinar la precisión interensayos, se probaron 10 muestras de concentración de P4 baja, 10 media y 10 altas por triplicado durante 3 días. Para determinar la precisión del inter-operador, 1 muestra de baja, 1 media y 1 alta concentración fueron probadas 15 veces cada una por 2 operadores.

La estabilidad de almacenamiento se evaluó utilizando 16 muestras de leche fresca que se alicuotaron y almacenaron a 2-8 °C o -20°C durante 24 horas. Antes del análisis, las muestras se equilibraron a temperatura ambiente (RT) durante 30 minutos y se mezcló vigorosamente con el apoyo del vortex. El sesgo se calculó como: $(P4_{stored} - P4_{fresh})/P4_{fresh} \times 100$. La prueba t para muestras pareadas se utilizó para determinar si la diferencia entre los niveles de P4 en muestras de leche fresca y almacenada era significativa. El análisis de correlación de rango ρ de Spearman probó la relación entre el sesgo y el nivel P4 en muestras de leche fresca.

Para probar los efectos de un conservante de muestra, se agregó una solución de dicromato de potasio a 50 ml de leche fresca para alcanzar una concentración final de 0.01-0.04%. Luego, una prueba t pareada comparó los niveles de P4 en 6 muestras de leche antes y después de la adición del conservante.

Como calibración preliminar, una muestra de leche de una vaca Simmental en celo (considerada "libre de progesterona" por RIA) fue inyectada con progesterona para alcanzar concentraciones finales de 5 ng / ml, 10 ng/mL y 15 ng/mL, y se midió el valor de mP para cada concentración. Los valores obtenidos se utilizaron para calcular la ecuación de regresión. A continuación, se utilizaron 18 muestras de leche en un estudio de comparación de métodos: 9 se originaron a partir de vacas Simmental en celo, y 9 de vacas Simmental preñadas de 2,5 a 4,5 meses. Los análisis de Bland-Altman y Passing-Bablok evaluaron la similitud de los resultados de FPA y RIA.

Correlación entre suero y leche P4

Se recogieron muestras de suero y leche de 6 vacas en celo y 34 vacas Simmental preñadas (un total de 40 muestras de suero y 40 muestras de leche). Las concentraciones séricas de P4 se midieron utilizando un RIA comercial, administrado por el Instituto de Aplicación de energía nuclear (INEP), Serbia, y las concentraciones de P4 de leche se midieron por FPA.

Rendimiento diagnóstico de FPA P4 en leche

Para determinar el rendimiento diagnóstico del ensayo, se utilizaron tres grupos de animales:

1. Veinte vacas Holstein-Frisonas eran de una granja en Feilding, Nueva Zelanda. Esta granja mantiene aproximadamente 400 vacas de ordeño que se mantienen libremente en un pasto. El manejo de la reproducción en esta granja de servidores incluye un protocolo de sincronización e IA. Los toros identificaron vacas que no concibieron después de la primera IA.
2. Catorce vacas Jersey eran de una granja en Feilding, Nueva Zelanda. La granja mantiene aproximadamente 800 vacas de ordeño que se mantienen libremente en un pasto. El manejo de reproducción en esta granja no incluye un protocolo de sincronización. La técnica de pintura de cola identificó animales en celo que luego fueron inseminados artificialmente. La pintura de la cola identificó las vacas, de nuevo, que no concibieron después de la primera IA.
3. Cinco vacas Simmental eran de varias mini-granjas en la región montañosa serbia de Dragacevo. Todas las vacas estaban bajo la supervisión total de un veterinario y examinadas cuidadosamente diariamente durante todo el experimento. Cabe señalar que esta parte del experimento evaluó la capacidad del ensayo para monitorear las concentraciones de P4 en la leche durante un ciclo de celo, pero no su capacidad como una "prueba temprana de no embarazo". Tres vacas estaban sincronizadas y dos no. Una vaca mostró "celo silencioso".

Estado del embarazo

Se utilizaron tres métodos para determinar el estado de embarazo de las vacas:

1. Ecografía transrectal a los 30-33 días post-IA (vacas Holstein-Friesian [n=8], vacas Jersey [n=14], vaca Simmental [n=1]).
2. IDEXX glicoproteína asociada al embarazo (PAG) iELISA a los 30 días después de la IA (vacas Holstein-Friesian [n=4]).
3. Detección de calor a los 18-25 días post-IA en 8 vacas Holstein-Friesian y en 4 vacas Simmental durante el ciclo de celo.

Protocolo de sincronización en vacas Holstein-Friesian

Brevemente, la sincronización se facilitó con inyecciones intramusculares de prostaglandina 2 α (PGF2 α) 23 días antes de TAI y hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), 10 días antes de TAI. Las vacas que no ciclaban también fueron tratadas con un dispositivo de progesterona vaginal (CIDR) durante una semana. Tres días antes de la TAI, todas las vacas fueron inyectadas con PGF2 α y gonadotropina coriónica equina (ECG).

Todas las vacas fueron inseminadas artificialmente y recibieron 2 ml de GnRH.

Recogida de muestras de leche

Se tomaron muestras de leche del cuarto sano de la ubre. Después de desechar los primeros 10-15 chorros, se recolectaron 50 ml de leche en un recipiente limpio. Las muestras de leche se analizaron para P4 el día de la recolección.

Las muestras de calostro del grupo de Holstein-Friesian se recogieron en el ordeño de la tarde (7-17 días después de la IA) con 2-4 días entre las colecciones, y las muestras se recogieron diariamente entre los días 17 y 23. En el grupo de Jersey, las muestras de calostro se recogieron en el ordeño matutino (1 día después de la IA) con 2-4 días entre colecciones, y las muestras se recogieron diariamente entre días. 18 y 24. La última muestra se tomó el día 26. En el grupo Simmental, las muestras de calostro se recogieron en el ordeño matutino (un día después de la IA) y cada día durante el mes siguiente.

Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software MedCalc®, versión 16.2.1. El valor de corte de P4 en leche para la detección de no embarazo se eligió de modo que arrojara una especificidad del 100%, 19-23 días después de la IA (es decir, ninguna de las vacas preñadas) fueron identificadas como no embarazadas según la concentración de P4 en la leche). Un valor de "P" inferior a 0,05 se consideró significativo.

Resultados y discusión

Rendimiento analítico de FPA P4 en leche

Precisión intraensayo

La Tabla 1 muestra los resultados de FPA para muestras de leche con 3 concentraciones diferentes de P4 (baja, media y alta). Cada muestra fue probada 10 veces por un operador. El rango de coeficiente de variación (CV) demuestra la fuerte repetibilidad del ensayo. El mean CV total para la repetibilidad fue del 5%.

Tabla 1. Precisión intraensayo para la FPA P4 en leche.

Concentración de P4	# de Pruebas	SD \pm media (Δ mP)	CV (%)
Bajo	10	24.5 \pm 1.3	5.4
Medio	10	89.1 \pm 2.9	3.2
Alto	10	105.6 \pm 6.7	6.3
CV medio total			5.0

CV: coeficiente de variación, SD: desviación estándar

Precisión inter-ensayos

La Tabla 2 muestra los resultados de FPA para 10 muestras de leche con 3 concentraciones diferentes de P4 cada una (baja, media y alta). Cada muestra se analizó por triplicado. El rango de coeficiente de variación (CV) demuestra la fuerte reproducibilidad del ensayo. La CV media total para la reproducibilidad fue del 8,5%.

Tabla 2. Inter-assay precision for the milk P4 FPA.

Concentración de P4	# de Pruebas	SD \pm media (DmP)	CV (%)
Bajo	30	19.3 \pm 2.4	12.3
Medio	30	72.3 \pm 6.1	8.5
Alto	30	100.6 \pm 4.7	4.6
CV medio total			8.5

Precisión inter-operadores

La Tabla 3 muestra los resultados de FPA de muestras de leche con 3 concentraciones diferentes de P4 (baja, media y alta). El rango de coeficiente de variación (CV) demuestra una buena reproducibilidad. La CV media total fue del 8,8%.

Tabla 3. Precisión entre operadores para la leche P4 FPA.

Concentración de P4	# de Pruebas	SD \pm media (Δ mP)	CV (%)
Bajo	15 x 2	19.3 \pm 2.6	13.2
Medio	15 x 2	72.3 \pm 6.0	8.3
Alto	15 x 2	100.6 \pm 4.8	4.8
CV medio total			8.8

CV: Coeficiente de variación, SD: Desviación estándar

Estabilidad de almacenamiento

Los resultados indican que la concentración de P4 es estable en las condiciones que se investigaron; los valores medios de sesgo son pequeños y la diferencia en las muestras individuales no es significativa (Tabla 4). Sin embargo, el rango algo amplio entre los valores de sesgo mínimo y máximo implica que los resultados deben confirmarse con un grupo más grande de muestras. Esto permitiría evaluar los valores de sesgo separados que corresponden a las diferentes concentraciones de P4 en las muestras de leche fresca.

Tabla 4. Estabilidad de almacenamiento de P4 en muestras de leche refrigeradas o congeladas durante 24h (n=16). Los valores de P4 y sesgo se presentan como mediana (mín-máx.), mientras que los valores de P se den para los análisis estadísticos.

Almacenamiento	P4 Δ mP	Bias %	t-test	ρ
Fresh	68.3 (13.9, 114.9)	/	/	/
2-8°C	68.9 (13.3, 111.5)	-1.3 (-39.7, 29.0)	0.561	0.485
-20°C	69.8 (11.3, 121.5)	4.3 (-48.8, 57.9)	0.402	0.387

(ρ) Correlación de rango ρ de Spearman

Efecto del dicromato de potasio

Las concentraciones de P4 antes de la adición de dicromato de potasio no cambiaron significativamente después de agregar el conservante (P = 0,415).

Tabla 5. Resultados de FPA P4 en leche (Δ mP) de muestras antes y después de la adición de dicromato de potasio.

Muestra	Antes	Después
1	14	13
2	19	10
3	19	15
4	19	21
5	46	50
6	63	61

Comparación entre FPA y RIA en muestras de leche

Los resultados de RIA y FPA de muestras de leche se compararon utilizando los análisis de Bland-Altman (Figura 1) y Passing-Bablok (Figura 2). Ambos análisis indican sesgo proporcional. Sin embargo, el sesgo no parece significativo desde el punto de vista diagnóstico, ya que ambos métodos muestran un patrón análogo de discriminación entre vacas preñadas y vacas en celo (Figura 3).

Figura 1. Gráfico de las diferencias entre RIA y FPA versus la media de las dos mediciones

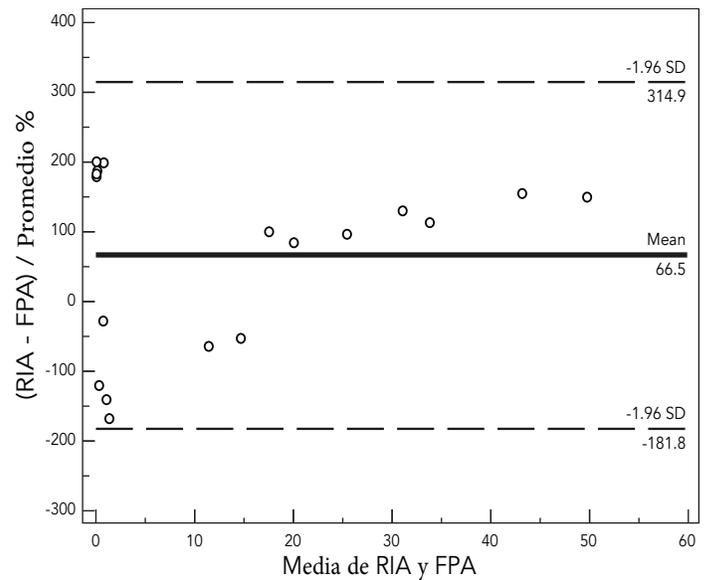


Figura 2. Línea de regresión Passing-Bablok

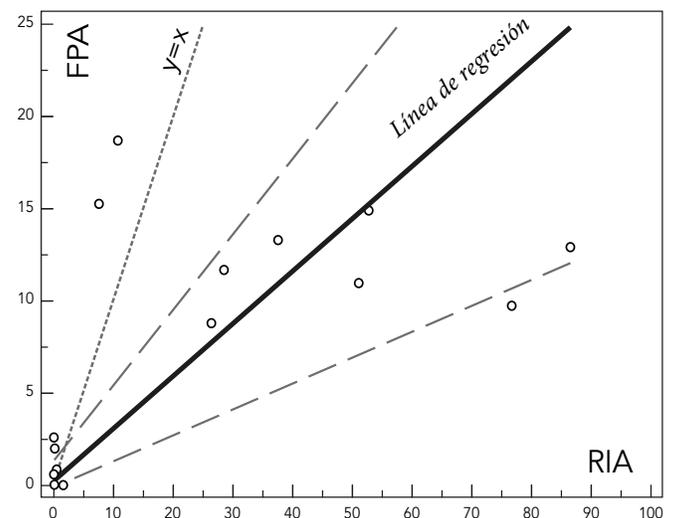
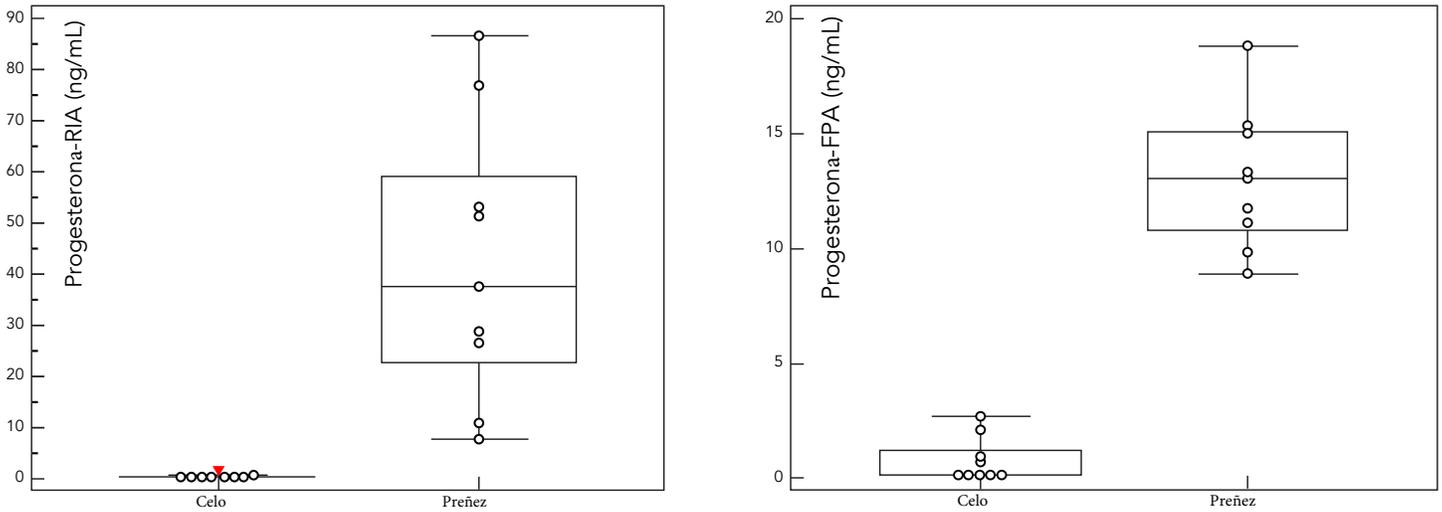


Figura 3. Concentración de P4 de leche en vacas en celo y en vacas preñadas determinada con RIA y FPA

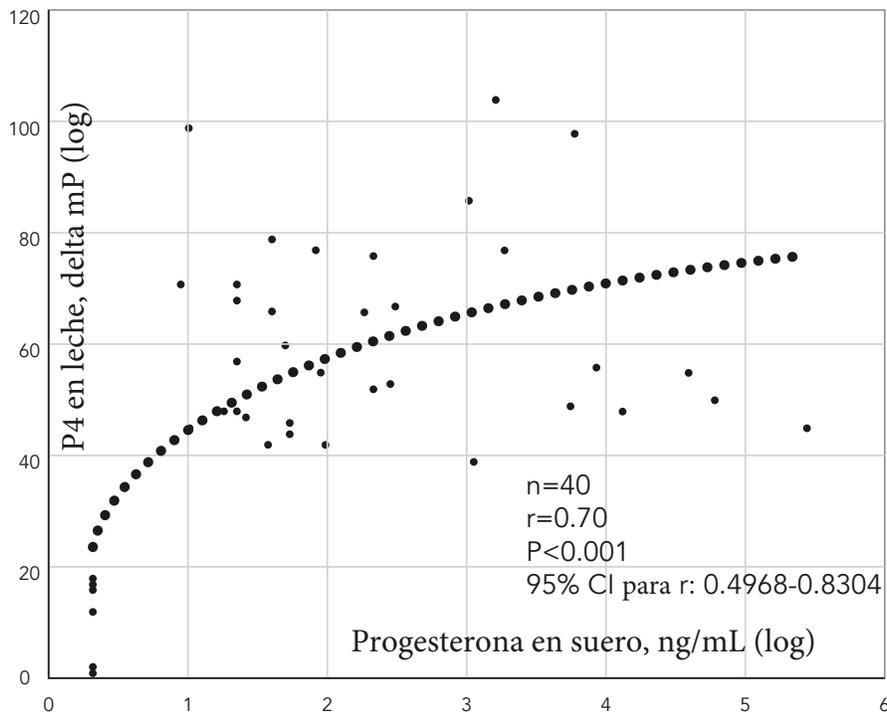


El FPA tiene una mayor resolución al determinar las concentraciones de P4 en muestras de leche, lo que facilita distinguir vacas en celo frente a vacas preñadas. Esto se ilustra por la amplia diferencia entre las concentraciones de P4 en leche de vacas en celo y vacas preñadas obtenidas a través de FPA (Figura 3). Esta resolución conduce a un ensayo más robusto. Los pequeños errores de pipeteo al realizar el ensayo no cambian el resultado diagnóstico.

Comparación de FPA en leche y RIA en muestras de suero

Después de que se biosintetiza en los ovarios, la placenta y las glándulas suprarrenales, P4 se libera en el torrente sanguíneo (Wiltbank et al., 2014) y se secreta en la leche, donde alcanza concentraciones más altas que en el suero. Por lo tanto, las concentraciones de P4 en suero y leche muestran una correlación positiva (Roelofs et al., 2006); esto fue confirmado por nuestros resultados (Figura 4).

Figura 4. Correlación entre la concentración de P4 en las muestras de suero y leche.



Rendimiento de diagnóstico

Vacas Holstein-Friesian

La concentración de P4 en la leche discrimina de manera confiable a las vacas preñadas de las no preñadas entre 19 y 23 días después de la IA (Figura 5). La Figura 5 muestra que las vacas Holstein-Friesian preñadas sin signos de calor ($n = 6$) o con signos de calor en el día 21 ($n = 3$) tenían un nivel alto de P4. El estado de preñez de estas vacas se confirmó mediante ultrasonido o PAG el día 30 después de la IA.

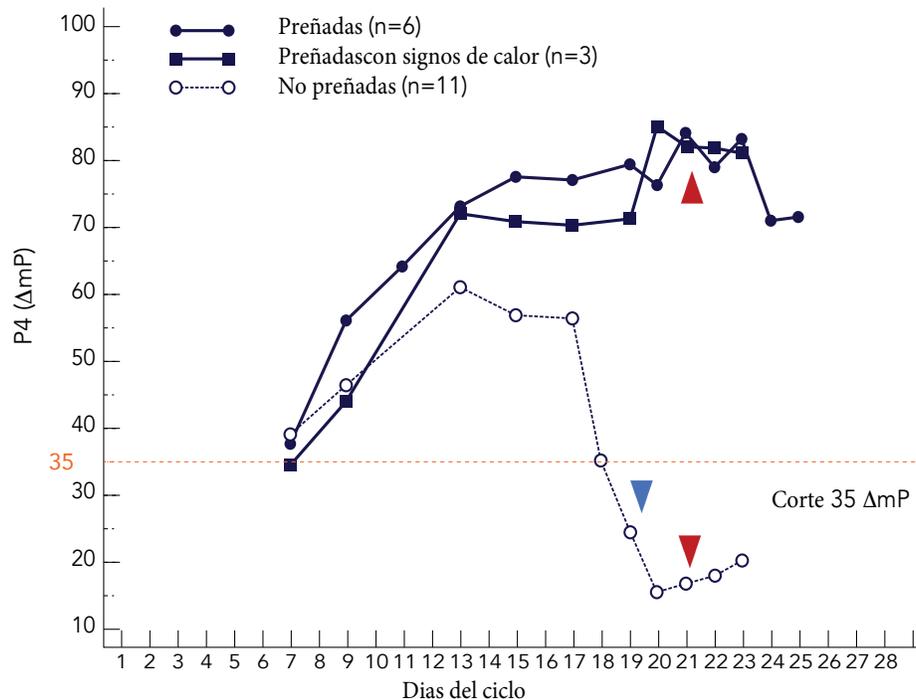
Es importante tener en cuenta que una medición baja de P4 FPA clasifica con precisión a las vacas como no preñadas; por lo tanto, la repetición de IA está específicamente dirigida. Además, las vacas no preñadas ($n = 11$) tuvieron una disminución significativa de P4 en el día 19 (valor medio), oscilando entre los días 15 y 22, y los signos de calor aparecieron de 2 a 3 días después de la disminución.

Combinación de resultados de ensayo recopilados de vacas que exhiben altos niveles de P4 en dos días consecutivos, o dos veces solo en los días 20 y 22, produciría una sensibilidad y precisión diagnóstica aún mayor. Idealmente, la sensibilidad y la precisión podrían alcanzar el 100% con una especificidad del 100%.

Cabe señalar, una vez más, que las vacas Holstein-Friesian investigadas se sincronizaron de modo que un periodo de pre-estro y estro, en donde hay una disminución P4 pudo determinarse con precisión en abierto vacas.

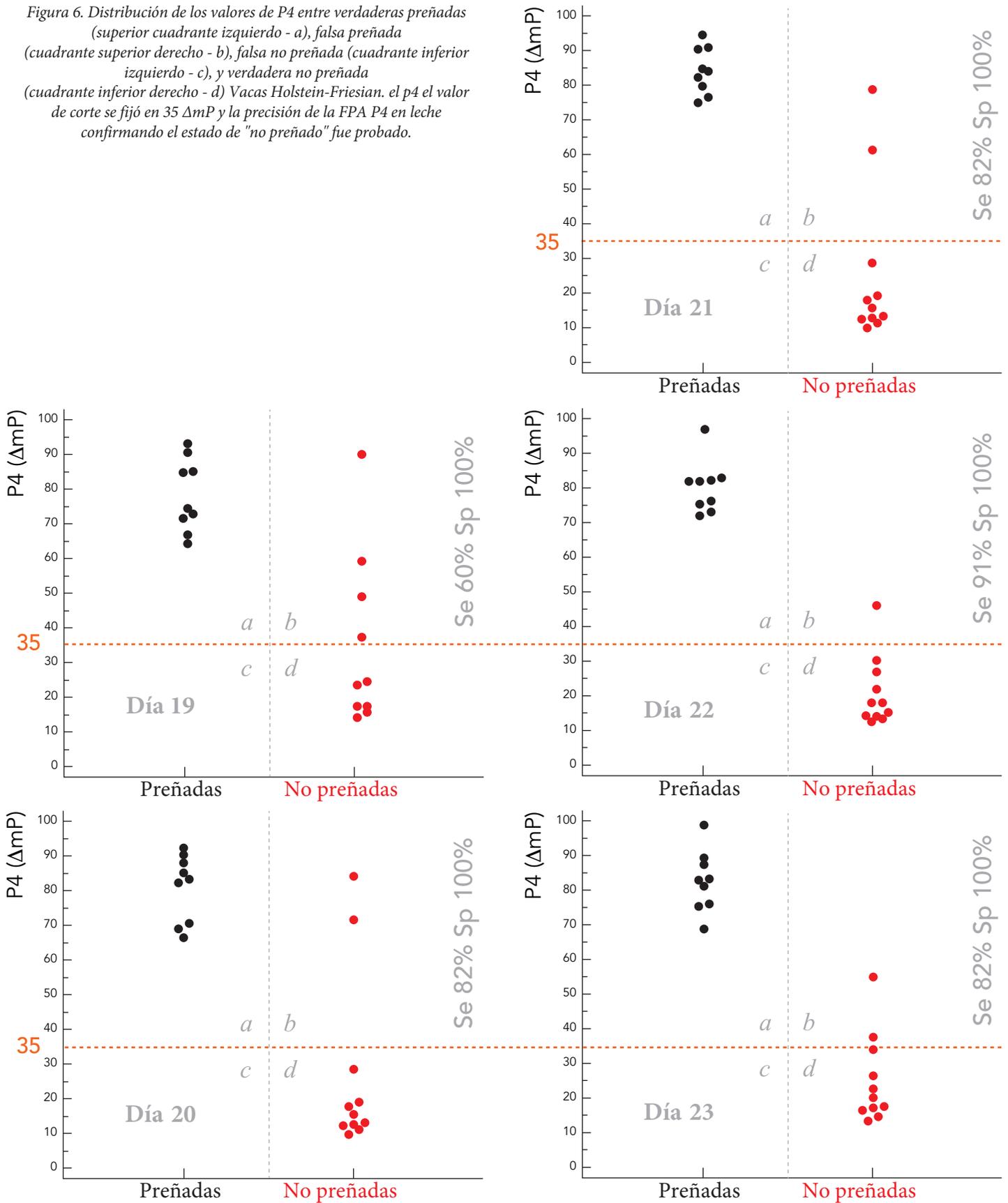
Lo más importante, es que, el valor de corte de 35 Δ mP produjo una especificidad del 100% a lo largo del estudio, lo que prevendría la IA repetida de vacas ya preñadas.

Figura 5. P4 en muestras de leche de un grupo de vacas Holstein-Friesian preñadas y no preñadas sincronizadas de Nueva Zelanda.



Se muestran los valores medios de vacas preñadas ($n = 6$), preñadas con calor ($n = 3$) y no preñadas ($n = 11$). En vacas no preñadas, P4 disminuyó significativamente (flecha azul) el día 19 (valor mediano) y el calor (flecha roja) apareció el día 21 (valor mediano). La línea horizontal representa el valor de corte de 35 Δ mP.

Figura 6. Distribución de los valores de P4 entre verdaderas preñadas (superior cuadrante izquierdo - a), falsa preñada (cuadrante superior derecho - b), falsa no preñada (cuadrante inferior izquierdo - c), y verdadera no preñada (cuadrante inferior derecho - d) Vacas Holstein-Friesian. el p4 el valor de corte se fijó en 35 ΔmP y la precisión de la FPA P4 en leche confirmando el estado de "no preñado" fue probado.



Vacas Jersey

La concentración de P4 en la leche distinguió de manera confiable a las vacas Jersey preñadas y no preñadas entre 19 y 23 días después de la IA (Figura 7). Sin embargo, tres vacas que tenían valores altos de P4 (por encima del límite de 35 Δ mP) entre los días 19 y 23 no estaban preñadas el día 30. Esto probablemente fue causado por un tiempo de celo mal calculado durante la IA (los Jerseys no estaban sincronizados), o la pérdida del feto después del día 23. En línea con esto, una de las tres vacas testeadas "no preñadas" el día 26 según la FPA P4 en leche. En otras cuatro vacas Jersey preñadas, una disminución en la concentración de P4 entre los días 18 y 23 fue seguida de manera confiable por el calor (Figura 7).

Curiosamente, en comparación con holstein, las vacas Jersey tuvieron una menor propagación en la concentración de P4 entre animales preñados y no preñados (Figura 7). Esto probablemente se deba a la influencia de la matriz en el rendimiento de FPA, o podría ser una característica fisiológica de la raza.

Se sabe que las vacas Jersey tienen una composición de leche diferente; por lo tanto, medir la concentración de moléculas hidrofóbicas como P4 en la leche es más desafiante.

Una mayor optimización del ensayo podría conducir a una precisión aún mayor. También es importante tener en cuenta que la leche P4 FPA fue 100% específica sin un solo diagnóstico erróneo de animales preñados.

Figura 7. Mediciones de P4 en leche de vacas Jersey no sincronizadas preñadas y no preñadas de Nueva Zelanda. El gráfico muestra los valores medios de las vacas preñadas (n=7) y no preñadas (n=4+3). En vacas no preñadas, P4 disminuyó por debajo del valor de corte en el día 19 (indicado con una flecha azul), y el calor apareció el día 21 (indicado con una flecha roja). La línea horizontal representa el valor de corte de 35 Δ mP.

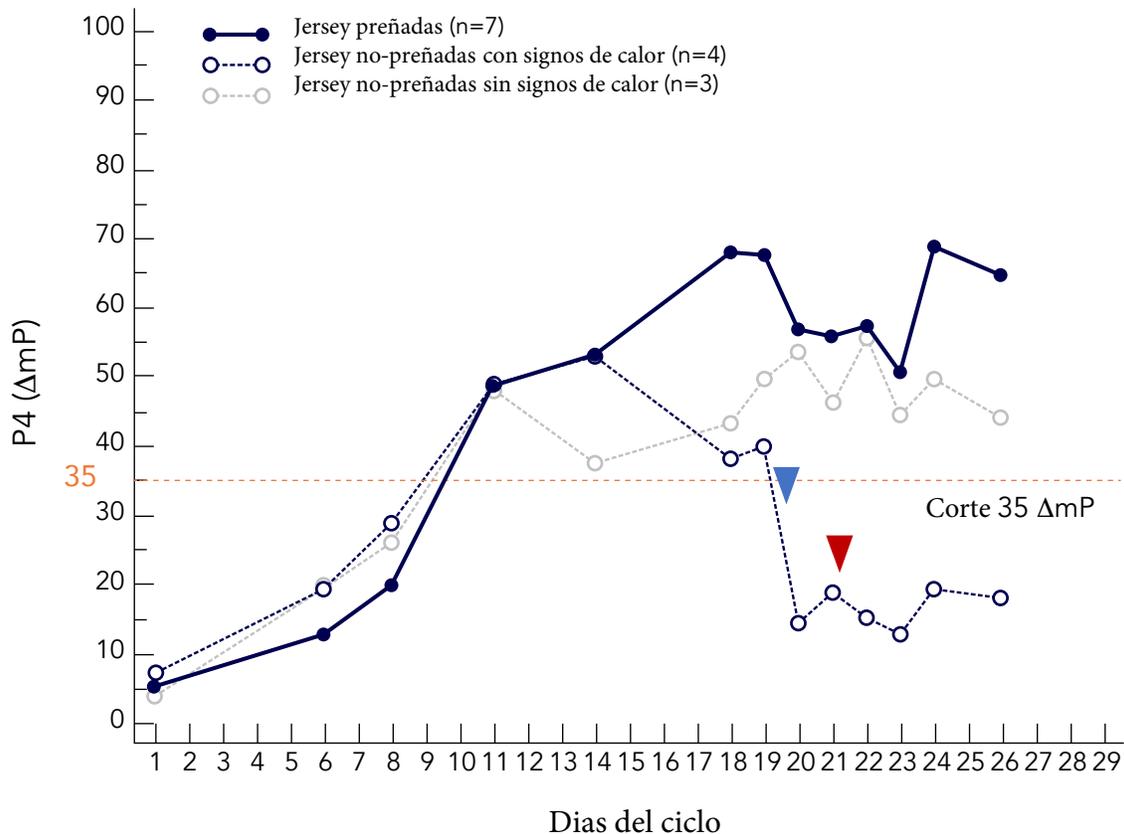
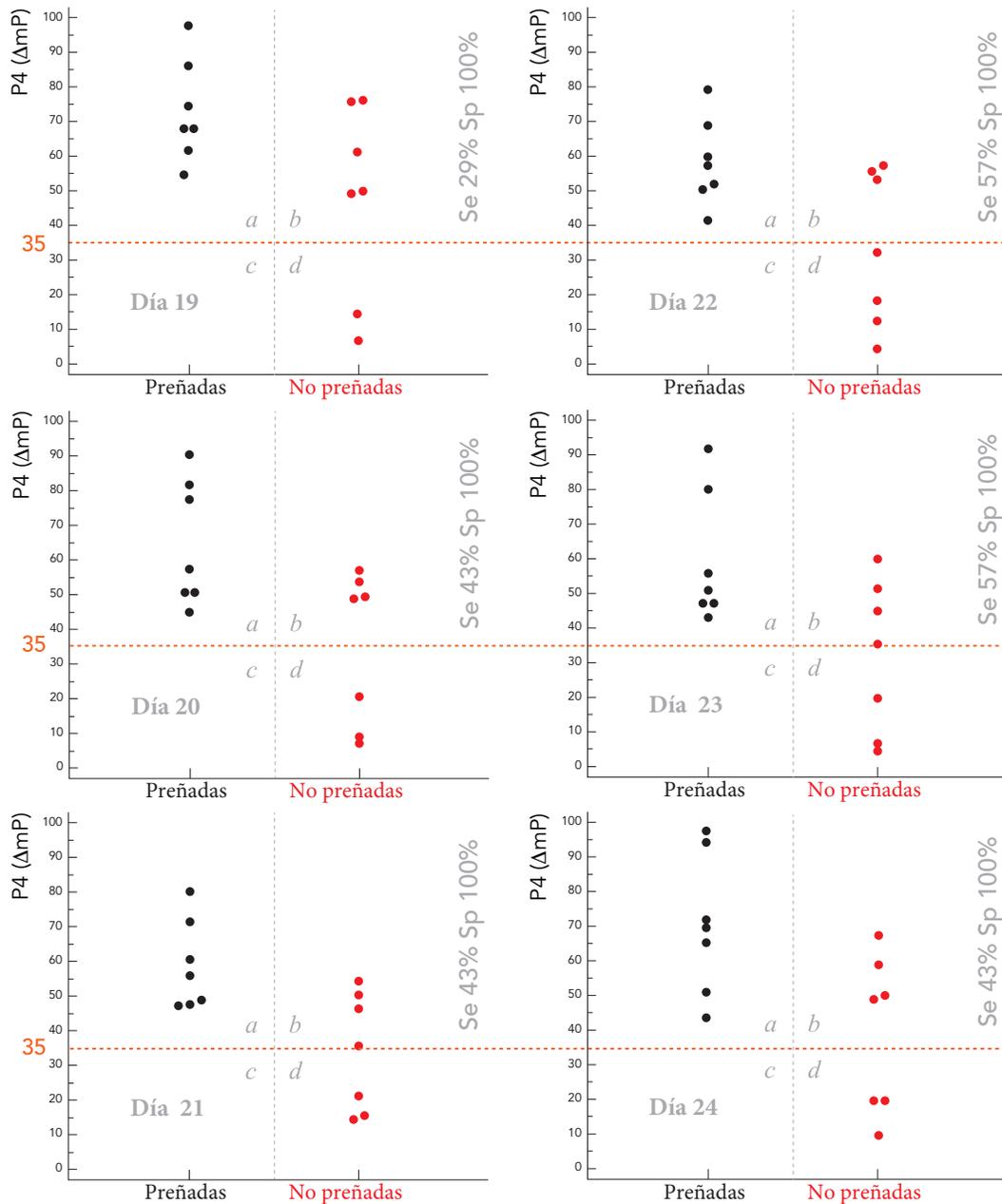


Figura 8. Distribución de los valores de P4 entre verdaderas preñadas (cuadrante superior izquierdo - a), falsas preñadas (cuadrante superior derecho - b), falsas no preñadas (cuadrante inferior izquierdo - c) y verdaderas no preñadas (inferior cuadrante derecho - d) Vacas Jersey. El valor de corte de P4 se estableció en

35 ΔmP , y se probó la precisión de confirmar el estado de "no preñada". Se muestran seis días consecutivos con valores de P4 de sección transversal para todas las vacas.



La Figura 8 muestra la sensibilidad y especificidad de FPA P4 en leche con más detalle cuando las vacas fueron testeadas en los días 19 a 24 y utilizando un valor de corte de 35 ΔmP . Cabe señalar que la sensibilidad del ensayo es menor cuando se aplica en vacas Jersey que en vacas Holstein-Friesian. Esto puede explicarse debido a que las vacas Jersey no estaban sincronizadas.

En consecuencia, el momento de la inseminación (el momento para la primera IA no se probó con la FPA P4 en leche) y todos los cálculos posteriores podrían haberse malinterpretado. Por lo tanto, estos resultados deben considerarse con precaución. Sin embargo, es interesante que el ensayo mostró su mayor sensibilidad en los días 21 y 22 en vacas Jersey (57%) y día 22 en vacas Holstein-Friesian (91%).

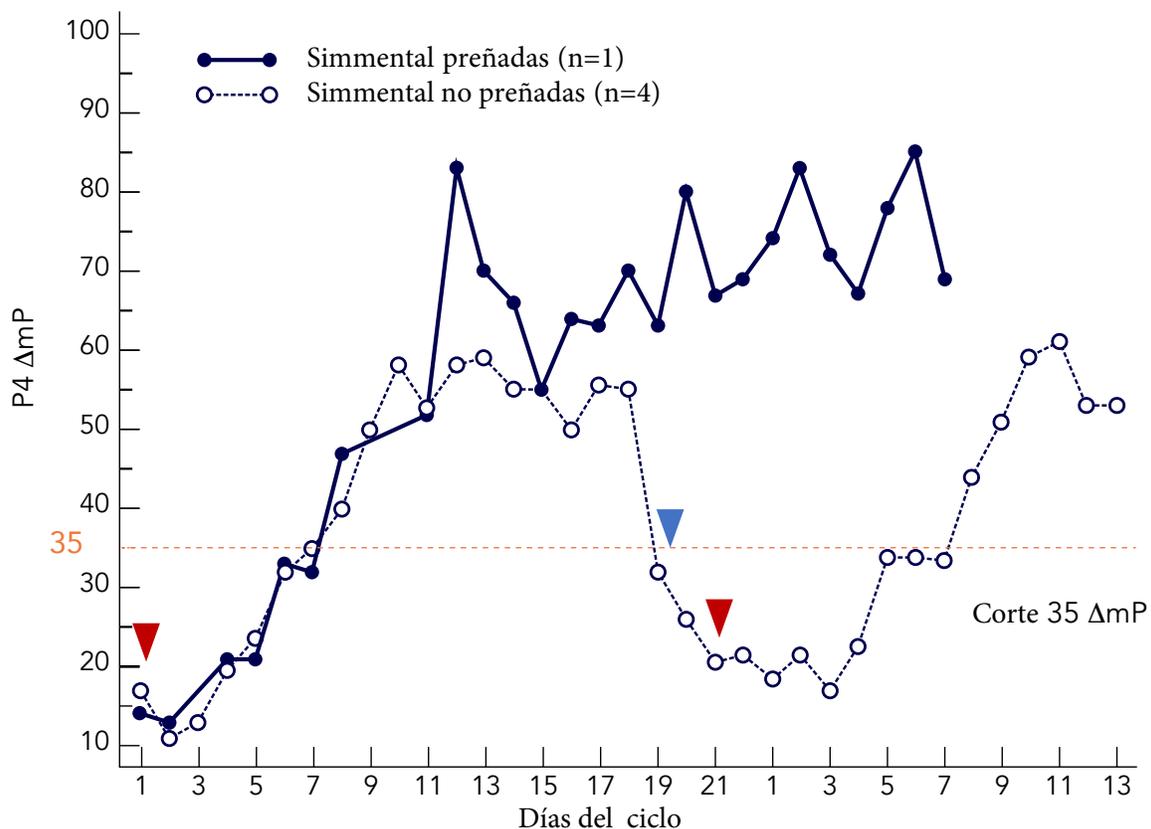
Vacas Simmental

Las concentraciones de P4 en leche de cinco vacas Simmental de Serbia se monitorearon diariamente durante un mes después de la IA. Una vaca preñada tuvo un aumento continuo en la concentración de P4 desde el día de la inseminación hasta el final del período de prueba.

Cuatro vacas no preñadas tuvieron una disminución en la concentración de P4 en el día 19 (valor medio) que osciló entre los días 17 y 20.

Entre ellos, la vaca con un celo silencioso tenía el mismo patrón P4 típico que todas las demás vacas no preñadas (Figura 9). En todas las vacas, los resultados del ensayo se correlacionaron fuertemente con el estado biológico.

Figura 9. Concentraciones de P4 en leche de muestras en un grupo de vacas Simmental de Serbia. El gráfico muestra los valores para una vaca preñada y los valores medios para las vacas no preñadas (n = 4). En vacas no preñadas, la P4 disminuyó por debajo del cut-off valor en el día 19 (indicado con una flecha azul), y el calor apareció en el día 21 (indicado con una flecha roja). La línea horizontal representa el valor de corte de 35 Δ mP.



Conclusión

Los datos de este informe demuestran inequívocamente el sólido rendimiento analítico y diagnóstico del FPA P4 en leche desarrollado por Ellie LLC. Una especificidad del 100% es crítica para evitar una inseminación repetida potencialmente peligrosa de vacas ya preñadas.

Las vacas preestrales y las vacas con celo silencioso también fueron identificadas consistentemente. En situaciones estrictamente controladas (por ejemplo, la inclusión de un protocolo de sincronización), este ensayo demostró una alta sensibilidad y especificidad.

Reconocimientos

Los autores desean agradecer al Dr. Miloš Jovičić por ayudar con el monitoreo diario de las vacas Simmental en nuestros experimentos preliminares en Serbia; Sra. Anne Tunnicliffe, Dr. Peter Aitken, Dr. Juan Klue y personal de Totally Vets Ltd. por su hospitalidad y ayuda

con los estudios realizados en Nueva Zelanda; y la Dra. Jelena Ajtić por su apoyo en la preparación de este informe técnico. Un agradecimiento especial al Dr. Richard Mahoney por organizar y apoyar todos nuestros esfuerzos para acercar las nuevas tecnologías a nuestros verdaderos clientes, los productores de leche.

Referencias

1. Flatland, B., Freeman, K. P., Friedrichs, K. R., Vap, L.M., Getzy, K.M., Evans, E. W., & Harr, K. E. (2010). Directrices de aseguramiento de la calidad de la ASVCP: control de factores analíticos generales en laboratorios veterinarios. *Patología Clínica Veterinaria*, 39(3), 264-277.
2. <https://www.fda.gov/media/70858/download>. Último acceso: 5 de mayo de 2018.
3. McDougall, S. (2010). Comparación de enfoques diagnósticos y un análisis costo-beneficio de diferentes enfoques de diagnóstico y tratamientos de vacas lecheras anoestros. *Journal Veterinario de Nueva Zelanda*, 58(2), 81-89.
4. McLeod, B. J., Foulkes, J. A., Williams, M. E., & Weller, R. F. (1991). Predicción del momento de la ovulación en vacas lecheras utilizando kits de progesterona en la granja. *Ciencia Animal*, 52(1), 1-9.
5. Roelofs, J.B., Van Eerdenburg, F. J.C.M., Hazeleger, W., Soede, N.M., & Kemp, B. (2006). Relación entre las concentraciones de progesterona en la leche y la sangre y el tiempo de ovulación en el ganado lechero. *Ciencia de la Reproducción Animal*, 91(3-4), 337-343.
6. Waldmann, A., & Raud, A. (2016). Comparación de una prueba de progesterona de milk de flujo lateral con inmunoensayo enzimático como ayuda para la determinación del estado reproductivo en vacas. *Registro Veterinario*.
7. Wiltbank, M.C., Souza, A. H., Carvalho, P. D., Cunha, A. P., Giordano, J. O., Fricke, P.M., Baez, G.M& Diskin, M. G. (2014). Efectos fisiológicos y prácticos de la progesterona sobre la reproducción en ganado lechero. *Animal*, 8(s1), 70-81.