







Tabla 3 Precisión entre operadores para la leche P4FPA.

Concentración de P4	# de Pruebas	SD $\pm$ media ( $\Delta$ mP)	CV (%)
Bajo	15 $\times$ 2	19.3 $\pm$ 2.6	13.2
Medio	15 $\times$ 2	72.3 $\pm$ 6.0	8.3
Alto	15 $\times$ 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 $\Delta$ mP	Bias %	t-test	$\rho$
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

( $\rho$ ) Correlación de rango  $\rho$  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 ( $\Delta$ 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

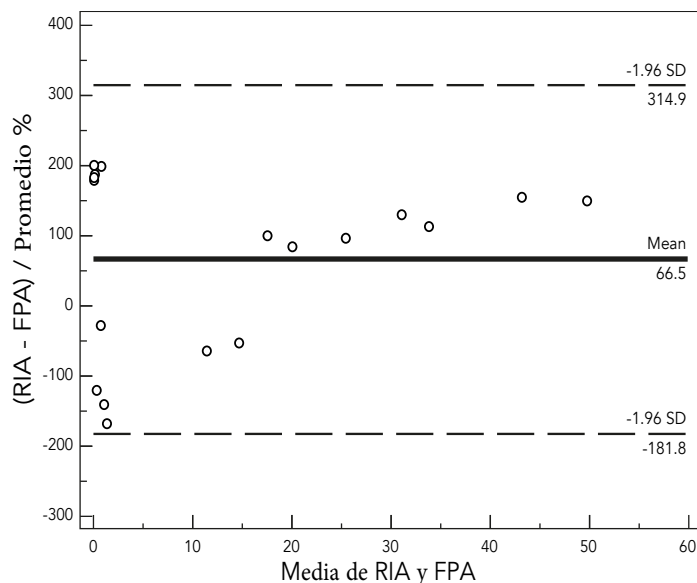


Figura 2. Línea de regresión Passing-Bablok

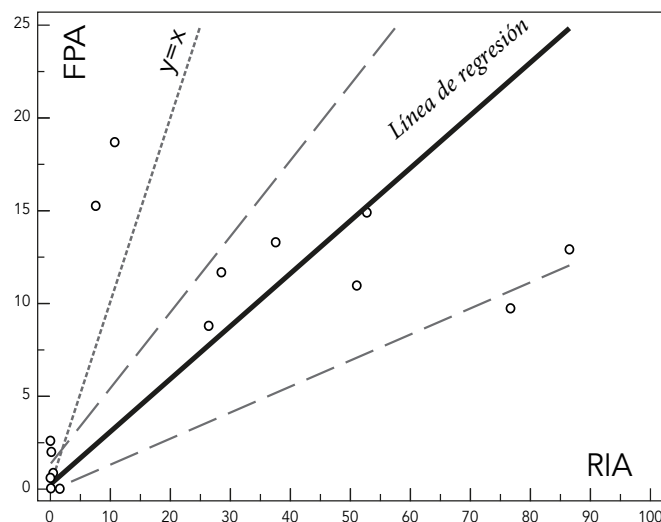
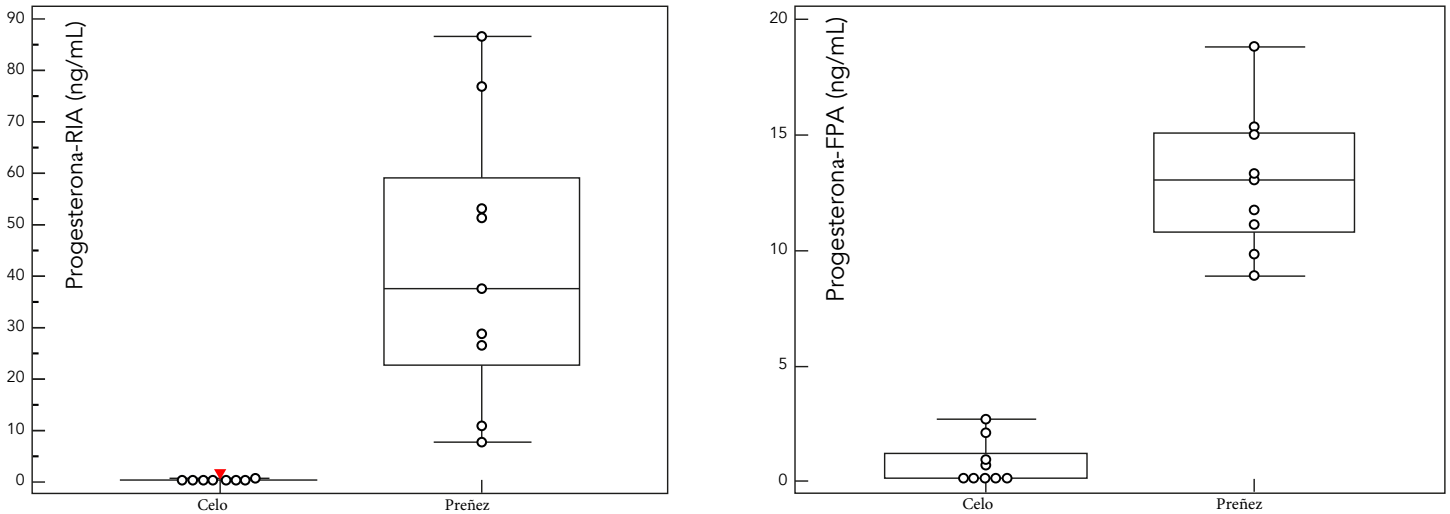


Figura 3. Concentración de P4 de leche en vacas en celo y en vacas preñadas determinada con RIA y FPA

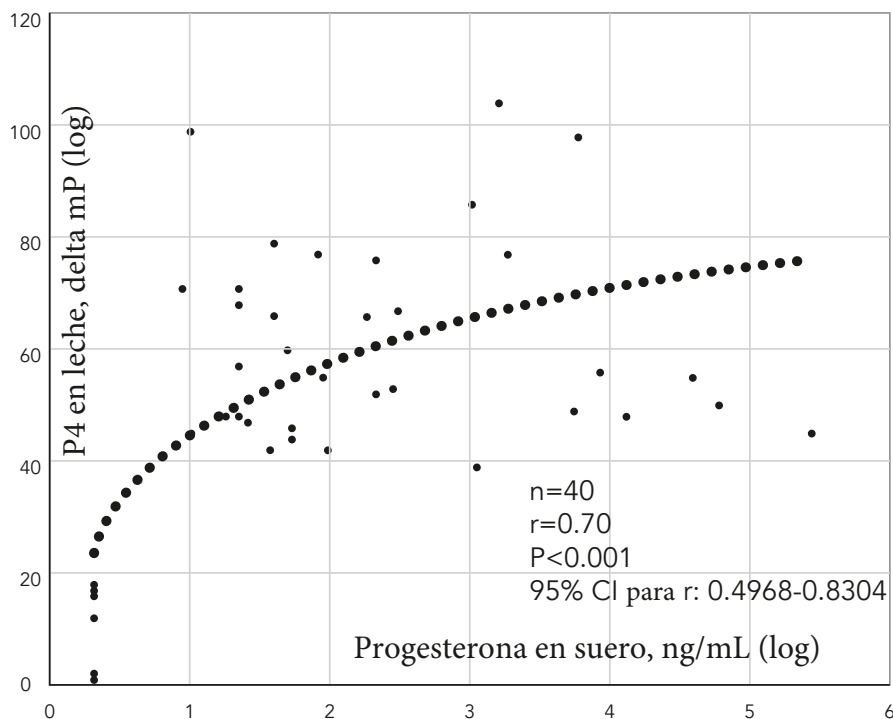


El FPA tiene una mayor resolución al determinar las concentraciones de P4 en muestras de leche, lo que facilita distinguir vacas en celo frente a vacas preñadas. Esto se ilustra por la amplia diferencia entre las concentraciones de P4 en leche de vacas en celo y vacas preñadas obtenidas a través de FPA (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.

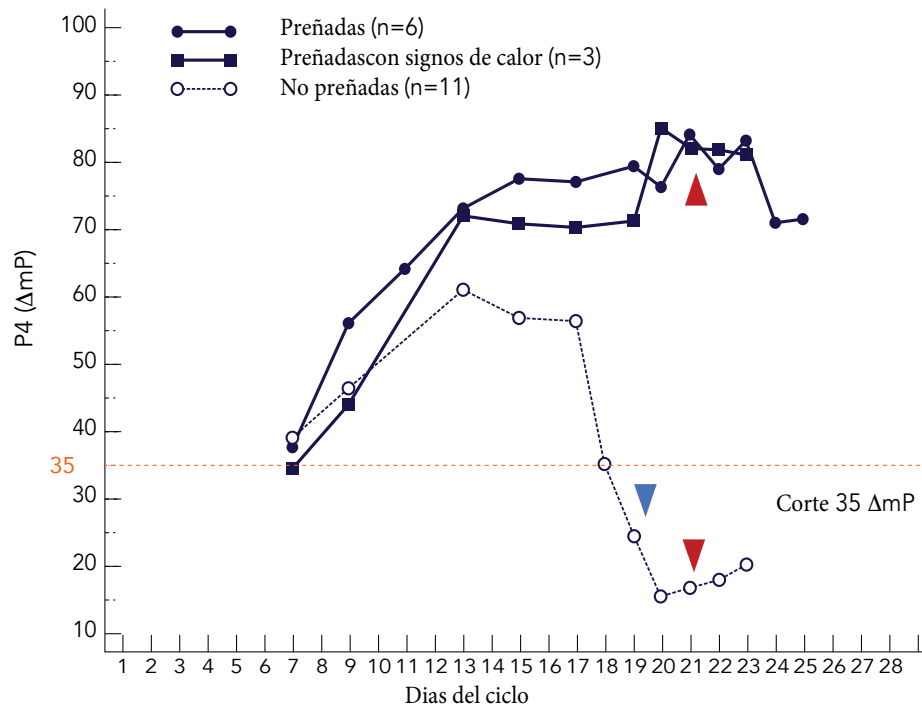
Es importante tener en cuenta que una medición baja de P4 FPA clasifica con precisión a las vacas como no preñadas; por lo tanto, la repetición de IA está específicamente dirigida. Además, las vacas no preñadas ( $n = 11$ ) tuvieron una disminución significativa de P4 en el día 19 (valor medio), oscilando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

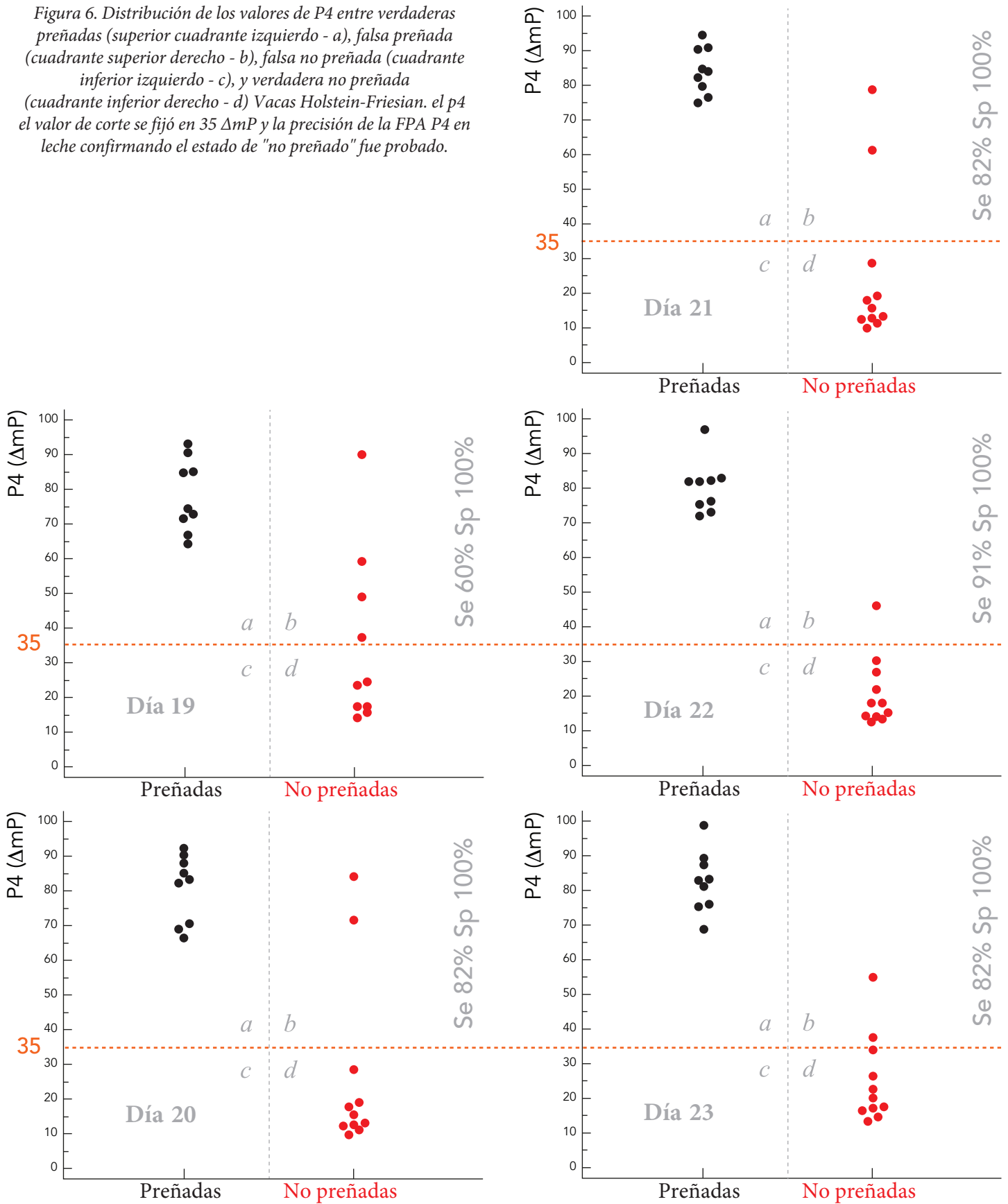
Lo más importante, es que, el valor de corte de 35  $\Delta$ mP produjo una especificidad del 100% a lo largo del estudio, lo que prevendría la IA repetida de vacas ya preñadas.

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  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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  $\Delta$ mP.

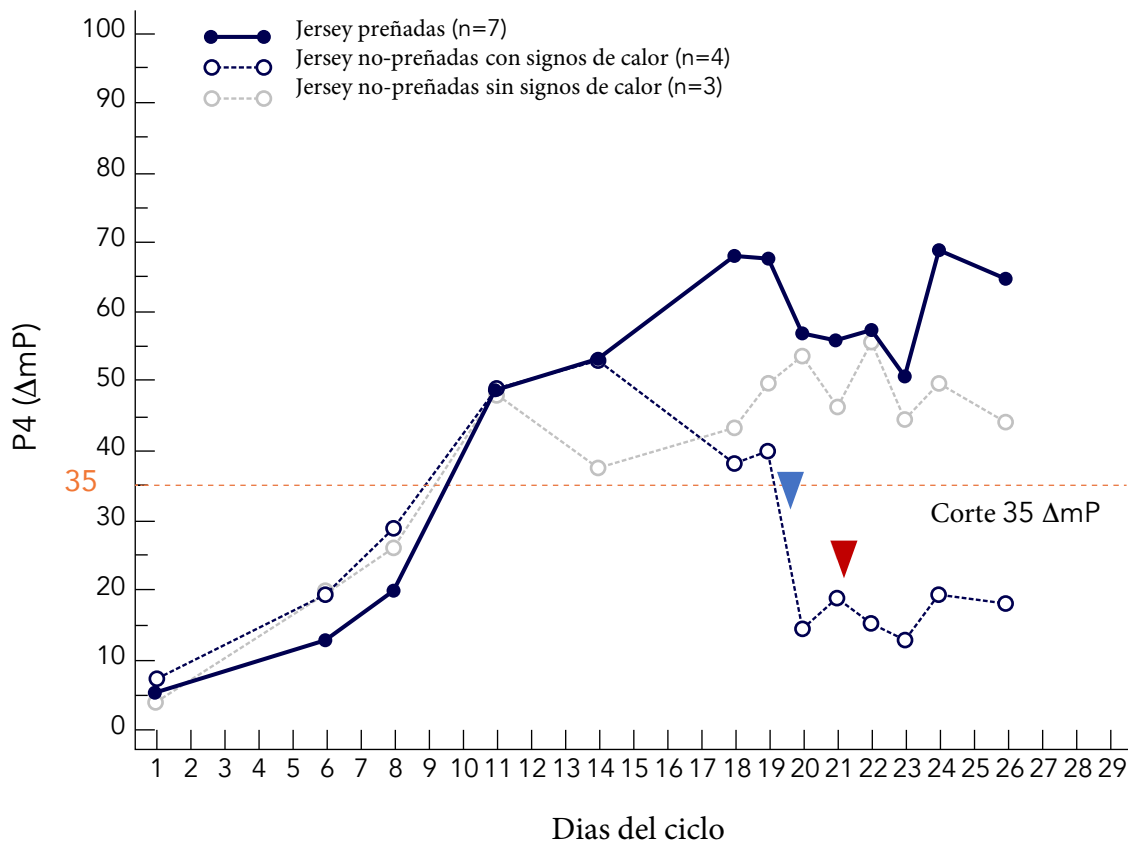
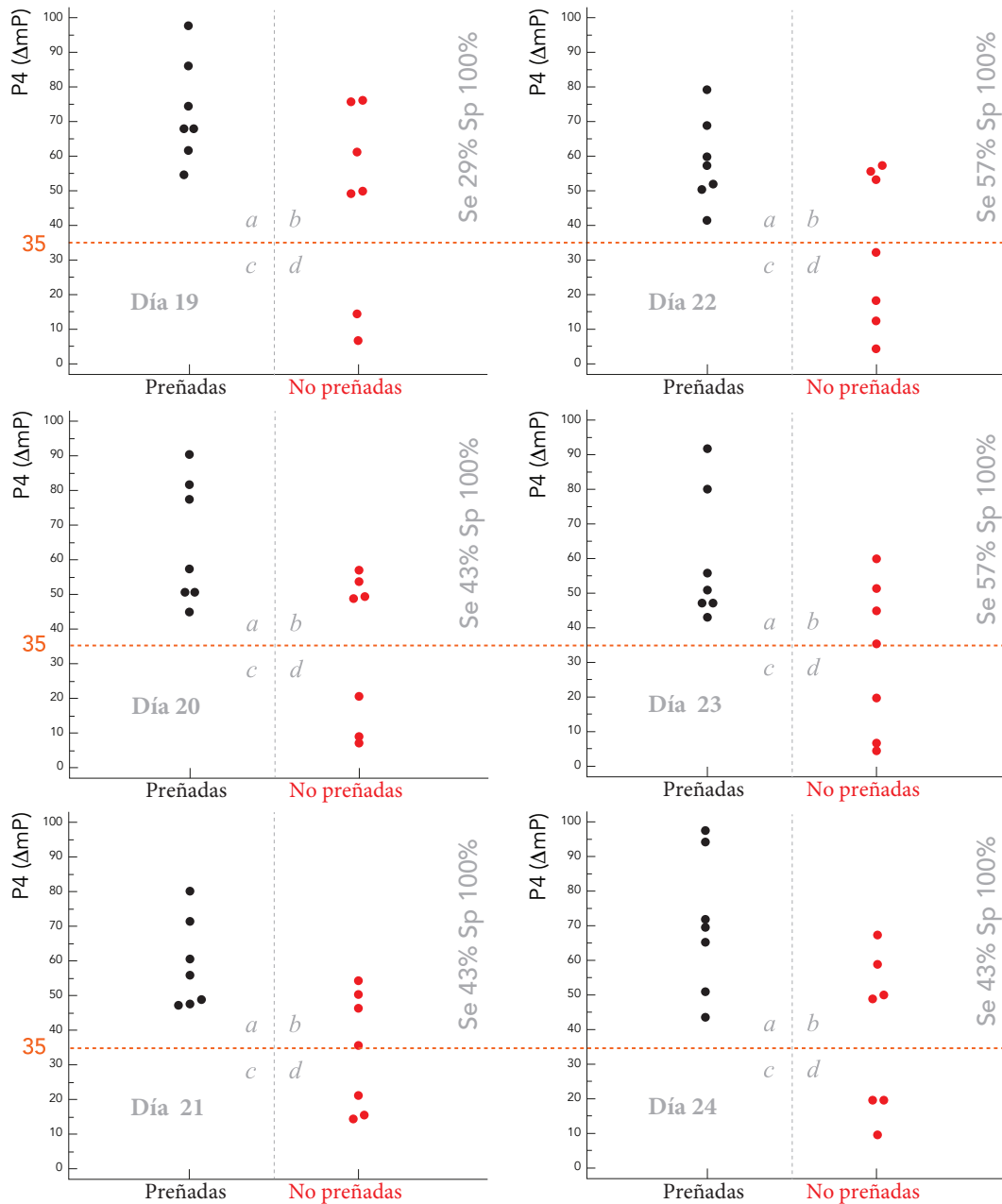




Figura 8. Distribución de los valores de P4 entre verdaderas preñadas (cuadrante superior izquierdo - a), falsas preñadas (cuadrante superior derecho - b), falsas no preñadas (cuadrante inferior izquierdo - c) y verdaderas no preñadas (inferior cuadrante derecho - d) Vacas Jersey. El valor de corte de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

35  $\Delta mP$ , 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  $\Delta mP$ . 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%).

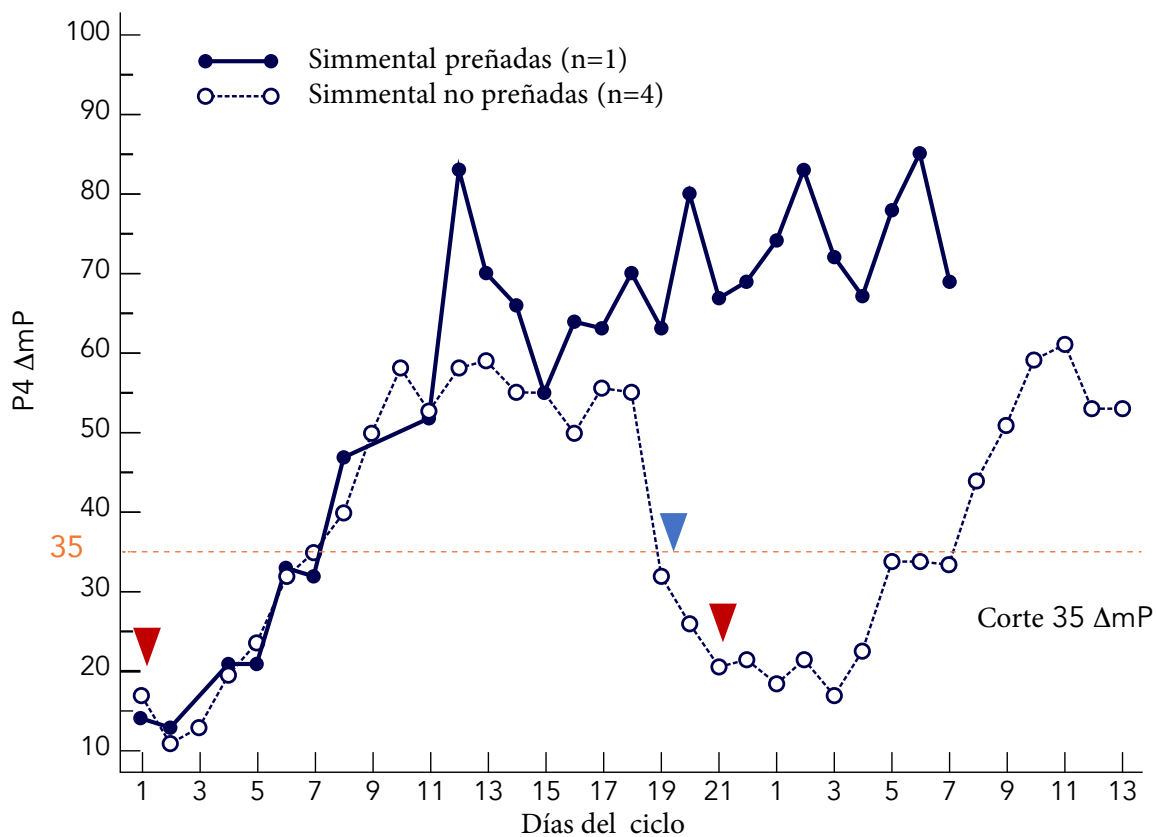
### Vacas Simmental

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  $\Delta$ 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 Tunncliffe, 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.