

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

**DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA EN LECHE MEDIANTE EIA: UNA
ALTERNATIVA DE DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN EN CABRAS**

Memoria de Título presentada como parte de
los requisitos para optar al TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.

ASTRID JEANISSE SEPERIZA WITTEW

VALDIVIA – CHILE

2005

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. JORGE CORREA S.

Nombre

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. FREDERICK AHUMADA M.

Nombre

Firma

Dr. NESTOR TADICH B.

Nombre

Firma

FECHA DE APROBACIÓN:

6 de septiembre de 2005

ÍNDICE

	Página
1. RESUMEN	4
2. SUMMARY	5
3. INTRODUCCIÓN	6
4. MATERIAL Y MÉTODOS	16
5. RESULTADOS	24
6. DISCUSIÓN	29
7. BIBLIOGRAFÍA	33
8. ANEXOS	36
9. AGRADECIMIENTOS	40

1. RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue diagnosticar gestación en cabras mediante la determinación de progesterona cualitativa y cuantitativa en leche entera a los 21 días post cubierta por medio del uso de enzima inmunoanálisis (EIA).

Para ello se utilizó 20 cabras mestizas Saanen previamente identificadas, clínicamente sanas, sincronizadas y cubiertas por monta dirigida. Las muestras de leche fueron recolectadas en la ordeña de la mañana durante el estro (M1), en el día 10 de la fase luteal (M2) y a los 21 días post cubierta (M3) comparándose ésta con los valores M1 y M2 para poder discriminar entre preñez y no preñez.

Se emplearon dos kits de EIA, uno cualitativo y otro cuantitativo. En el primero, se comparó la coloración de las muestras M3 con los estándares y las muestras M1 y M2, considerando diagnóstico positivo de preñez cuando coincidieron con M2 y el estándar de progesterona alta, presentando una coloración amarillo pálido. En el ensayo cuantitativo, se obtuvo la densidad óptica de las muestras mediante un equipo lector para ELISA y mediante la construcción de una curva logarítmica se determinó las concentraciones de progesterona y se estableció los valores promedios para M1 y M2, se consideró indicador positivo de preñez a los valores M3 que se asemejaron al promedio de M2. Estos ensayos fueron comparados con radioinmunoanálisis (RIA) y ultrasonografía transrectal.

Mediante la determinación cuantitativa de progesterona por EIA se obtuvo valores inferiores a 4 ng/ml en la fase periestral y superiores a 60 ng/ml en la fase luteal. A los 21 días post cubierta se determinó un 100% de gestación mediante EIA cualitativo, EIA cuantitativo y RIA, a diferencia de la ultrasonografía que presentó sólo un 65% de preñez. Estos resultados se verificaron mediante ultrasonografía a los 53 días post cubierta, confirmando un 100% de preñez y de esta forma ratificando los resultados obtenidos por EIA y RIA.

De este estudio se concluye que es posible realizar diagnóstico de gestación temprana en cabras, a los 21 días post cubierta, mediante la detección de progesterona cualitativa y cuantitativa en leche entera por EIA y que el kit para la determinación cualitativa podría incorporarse como una nueva herramienta al manejo reproductivo caprino por sus atributos en la utilización en terreno, además de no requerir material adicional, ser totalmente inocuo para el animal, ser rápido y fácil de usar.

Palabras claves: Diagnóstico de gestación, cabras, progesterona, EIA, RIA y ultrasonografía.

2. SUMMARY

DETERMINATION OF PROGESTERONE IN MILK BY EIA: AS AN ALTERNATIVE TO PREGNANCY DIAGNOSIS IN DAIRY GOATS

The aim of this study was to diagnose pregnancy in dairy goats through the determination of qualitative and quantitative progesterone in whole milk at 21 days after mating using enzymeimmunoassay (EIA).

Twenty healthy goats were selected, synchronized and handmated. Milk samples were collected in the morning milking: during oestrus (M1), day 10 of the luteal cycle (M2) and day 21 after mating (M3). M3 were compared with M1 and M2 values to discriminate between pregnant and non pregnant.

For pregnancy diagnosis, two kits of EIA were used, one qualitative and other quantitative. For the qualitative essay, the colour of M3 samples were compared with the standards and with M1 and M2 samples. Positive pregnancies were considered when M3 samples resembled to M2 and to high progesterone standard, which meant a pale yellow colour. In the quantitative assay kit, the optical density of the samples was obtained with an ELISA reader equipment. By making a logarithmic curve, the concentration of progesterone was determined. The average values were obtained for M1 and M2, and finally, they were considered positive pregnancy diagnosis when M3 values were similar to the average of the concentration of M2. Those essays were compared with radioimmunoassay (RIA) and transrectal ultrasound.

By means of quantitative determination of progesterone by EIA, values lower than 4 ng/ml were obtained close to oestrus and values higher than 60 ng/ml in the luteal cycle. The accuracy of early pregnancy diagnosis by qualitative EIA, quantitative EIA and RIA were 100% at 21days after mating, but ultrasound was only 65%. Those results were confirmed by ultrasound examination 53 days after mating and the pregnancy was 100%. With this result is ratified the essays by EIA and RIA.

This study concludes that it is possible to have early pregnancy diagnosis in dairy goats, as early as 21 days after mating, with progesterone determination in whole milk by EIA. The qualitative assay kit could be incorporated as a new instrument to the reproductive management of dairy goats because it can be used in field, without additional materials, it is absolutely safe for the animal, simple and quick to use.

Keywords: Pregnancy diagnosis, dairy goats, progesterone, EIA, RIA and ultrasound.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ANTECEDENTES

En Chile, la producción caprina tuvo su origen en animales traídos por los primeros colonos españoles, quienes explotaron su carne y leche. En la actualidad, la existencia de caprinos a nivel nacional es del orden de 727.310 cabezas (INE 2003), de las cuales, la mitad se concentran en la IV región del país, el resto de la población que produce alrededor del 55% de la leche de cabra nacional, se encuentra diseminado en todo el país. Es importante destacar, la formación de algunas lecherías con mayor desarrollo tecnológico, en la región Metropolitana y hacia las regiones VII y VIII, con fuerte incorporación de razas lecheras de origen suizo, principalmente, Saanen.

El manejo reproductivo es un pilar fundamental para alcanzar la eficiencia productiva en una explotación pecuaria. Uno de los aspectos más importantes, tanto desde el punto de vista del manejo reproductivo, como de la rentabilidad de los rebaños caprinos, es el diagnóstico temprano de gestación.

Para el manejo eficiente de rebaños caprinos, principalmente lecheros, es indispensable diagnosticar con acierto y lo más pronto posible la gestación, de esta forma si la hembra no está gestante pueda ser cubierta nuevamente y a la brevedad posible y realizar el manejo adecuado en cada caso.

Existen varios métodos utilizados para diagnosticar gestación, algunos de tipo presuntivo, otros de laboratorio y clínicos. La elección del método depende de la etapa de gestación, el costo, la exactitud y la rapidez del diagnóstico (Jainudeen y Hafez 2000).

3.2 CAPRINOS EN CHILE

3.2.1 Población

En Chile, el 80% de los caprinos corresponde a animales criollos provenientes de cruza con cabras originarias de España y otras de otros países europeos. Esta situación hace que exista gran variabilidad, incluso en animales de un mismo rebaño. En general, se trata de un animal de alzada regular, con producciones muy variables de carne y leche (Cofré 2001).

La población caprina del país ha mostrado sus altibajos en las últimas décadas (Cuadro 1), toda vez que entre los años 1965 y 1975 pasó de poco más de 900 mil a más de 1,1 millón de ejemplares, para descender en 1997 a una cifra ligeramente superior a las 700 mil cabras, con un 42% de ellas ubicadas en la IV Región (Cofré 2001).

Cuadro 1: Censo caprino en Chile por regiones (INE 2003)

Regiones	Número	
	1965	1997
I	6.484	10.838
II	3.895	6.046
III	37.740	40.710
IV	341.145	306.022
V	57.267	73.693
VI	45.279	36.481
VII	54.031	69.789
VIII	94.835	65.815
IX	136.227	60.642
X	130.455	26.952
XI	8.685	13.300
XII	30	95
Metropolitana	16.934	16.927
Total	933.007	727.310

3.2.2 Producción caprina

La producción caprina en Chile ha estado orientada, principalmente, hacia la producción de leche para la elaboración de queso y la producción de carne. La primera con más tradición en la IV Región, aunque expandiéndose en los últimos años hacia la zona sur, y la segunda, fundamentalmente para autoconsumo a lo largo del país y excepcionalmente para venta a los turistas durante las vacaciones.

Las producciones medias de leche fluctúan entre 100 y 450 litros en lactancias de 170 a 300 días para cabras Criollas y de razas especializadas, respectivamente. Estimaciones nacionales indican que en el país habrían más de 355 mil cabras lecheras, cifra que correspondería a casi la mitad del censo caprino del país. La producción de leche de las mismas, superaría las 42 mil toneladas de leche, estando un porcentaje mayoritario de la misma fuera de la Cuarta Región, es decir, hacia el sur del país, situación que daría más opciones de desarrollo al rubro (González 1998).

3.2.3 Sistemas de producción

Sólo en los últimos años se ha extendido el negocio del caprino de leche desde la IV Región hacia el resto del país, razón por lo que puede considerarse una nueva actividad dentro de la ganadería nacional.

Según Cofré 2001, los sistemas de producción caprina consideran:

Sistema tradicional. Predominante en la IV Región, basado en el crecimiento de la pradera natural de secano. Construcciones mínimas o inexistentes. Partos en agosto-septiembre, crianza de cabritos con la madre, destete natural, ordeña una vez al día en condiciones de poca higiene. En general, no existe selección de animales ni manejo de reemplazos.

Sistema mejorado. Predominante en la V Región y las cercanías de la Región Metropolitana, presenta encastes separados en diciembre-enero con partos en junio-julio o en octubre-noviembre con partos en marzo-abril. Alimentación con forrajes arbustivos, praderas naturales y recursos suplementarios como alfalfa, trébol alejandrino, residuos agrícolas e industriales. Se hace mejoramiento por selección, uso de registros, corrales, comederos, bebederos, sala de ordeña, henil y enfermería. El sistema de crianza varía entre amamantamiento natural con la madre con destete definido y crianza artificial.

Sistema intensivo. Se encuentra en el sector industrial caprino en las cercanías de la Región Metropolitana. Trata de producir leche todo el año con encastes en diciembre-enero y junio-julio. Requiere forrajes de calidad, preferentemente alfalfa producidos bajo riego y utilización de concentrados. Crianza artificial de cabritos.

3.3 SISTEMA REPRODUCTIVO DE LA CABRA

3.3.1 Característica sexual

Las cabras se consideran poliestricas estacionales, es decir con varios celos, su estación reproductiva se inicia en Otoño y paren en primavera. La duración de la temporada de apareamiento varía con la duración del día, raza y nutrición (Santa María y col 1990).

La estacionalidad está regida por el fotoperíodo, donde la actividad estral se inicia en la época de duración decreciente del día. No se comprende del todo la manera en que las señales fotoperiódicas son convertidas en mensajes neuroendocrinos. Las cabras detectan los cambios en la iluminación y es transmitida al eje hipotálamo – gónadas, vía la glándula pineal. La melatonina, una hormona pineal, media la respuesta a los cambios en el fotoperíodo. Las concentraciones de esta hormona son altas durante períodos de oscuridad y bajas durante períodos de luz (Deveson y col 1992).

3.3.2 Pubertad

La pubertad, o edad de la primera ovulación en la hembra, se presenta entre los cinco y siete meses de edad. La madurez del aparato reproductivo y el inicio de la actividad sexual es altamente dependiente del grado de desarrollo corporal y en el cual, una buena alimentación juega un rol fundamental; otros factores importantes en la aparición de la pubertad son la raza y la época de nacimiento. De este modo, la cabrita puede empezar a cubrirse cuando haya alcanzado el 75% de su peso corporal adulto, esto es aproximadamente 30 kg. (Bonilla 2001).

3.3.3 Ciclo estral

La duración del ciclo estral normal en la cabra es de 21 días, aunque existen variaciones producto de la raza, estación reproductiva y estrés ambiental (Jainudeen y col 2000).

El estro dura 24 a 48 horas en la cabra, la que está influida por raza, edad, estación del año y presencia de macho. El estro es más corto al principio y al final de la temporada reproductiva, en presencia del macho y en la primera temporada de apareamiento de las hembras jóvenes. La variabilidad en la duración del estro en la cabra, se debe principalmente al momento de presentación de la onda preovulatoria de la hormona luteinizante (LH), que ocurre en horas posteriores al inicio del estro. La ovulación en la cabra ocurriría unas 18 a 24 horas después de ocurrido el pico de LH (Jainudeen y col 2000).

Una cabra en estro es fácilmente identificable. A partir de unas 24 horas antes de aceptar la cópula, se encuentra inquieta, bala y orina con frecuencia, agita la cola de manera constante y rápida, además puede reducir su apetito y producción de leche. La vulva se puede encontrar edematosa y con secreción de moco por la vagina (Bonilla 2001).

Las cabras son ovuladoras espontáneas, la mayoría ovula entre las 24 y 36 horas después del inicio del estro. Durante el estro se pueden liberar dos o más óvulos. Esta tasa está influenciada por la edad y alcanza un máximo entre los tres y seis años, para luego declinar gradualmente. También por la época del año, nutrición, tamaño corporal, peso, condición física y genotipo (Jainudeen y col 2000).

3.3.4 Gestación

El tiempo normal de gestación es de 150 días con una variación promedio de 2 días. La fecundación se produce en la ampulla tubárica. El óvulo fecundado desciende por el oviducto hacia el útero y durante el descenso se divide en dos células alrededor de 24 horas post fecundación, 3 a 4 días después, cuando el embrión posee ocho a dieciséis blastómeras, ingresa al útero. El día 11 post cubierta la vesícula trofoblástica comienza a elongar y el día 13 se extiende al cuerno uterino contralateral. El reconocimiento materno de la preñez ocurriría alrededor del día 13 de gestación y la implantación a partir del día 18 (Smith 1997).

El cuerpo lúteo de la preñez persiste toda la gestación, y es la fuente principal de progesterona para la implantación del embrión y el mantenimiento de la preñez (Jainudeen y col 2000).

3.4 DIAGNÓSTICO DE GESTACIÓN TEMPRANA

Se considera diagnóstico precoz de gestación el que se realiza dentro del primer tercio de gestación de la cabra (antes de los 40 a 50 días). Para ello existen diferentes técnicas, las que podemos clasificar en técnicas presuntivas, técnicas de laboratorio y técnicas clínicas.

3.4.1 Técnicas presuntivas

Tal como dice su nombre estas técnicas hacen que se presuma que existe gestación, pero no hay certeza. La más conocida es el **no retorno al estro**, ya que durante la preñez, el embrión inhibe la regresión del cuerpo lúteo e impide que la cabra vuelva al estro. Por ello se supone que una hembra que no vuelva a presentar estro está preñada (Jainudeen y Hafez 2000). Sin embargo, en ocasiones las hembras pueden no exhibir manifestaciones de estro por factores como estrés ambiental o lactacional, o simplemente no ciclar por razones como hidrometra o patologías ováricas (Engeland y col 1997). El no retorno al estro, puede determinarse entre los días 18 a 24 de gestación con la presencia de un chivato por 15 a 30 minutos en la mañana y en la tarde, obteniéndose una exactitud en la predicción de preñez del 86% y de no preñez del 100% (Engeland y col 1997).

3.4.2 Técnicas de laboratorio

Estas técnicas se basan en la detección de cambios que ocurren en los tejidos maternos que rodean a un posible embrión o de sustancias procedentes de él, y se realizan mediante pruebas inmunológicas en sangre, orina o leche materna.

- **Biopsia Vaginal:** Técnica empleada en ovinos y cerdas. La mucosa vaginal reacciona a los cambios endocrinos que ocurren durante la preñez con un decremento en el número de capas del epitelio escamoso estratificado. Dado que este método implica muestreo, procesamiento y examen microscópico, su aplicación práctica es limitada (Ishwar 1995).
- **Progesterona:** Es el método de laboratorio más usado para detectar preñez, aunque no es una hormona específica de este estado, la progesterona puede emplearse como prueba debido a que el cuerpo lúteo persiste durante el principio de la gestación en todos los animales domésticos. Las concentraciones de progesterona se miden en líquidos biológicos como sangre y leche cuando están disminuyendo en hembras no preñadas. Normalmente, la muestra se recolecta durante el tiempo que dura un ciclo estral después de la cubierta, esto es 18 a 22 días en cabras. En este período de muestreo la concentración de progesterona es baja en la hembra no preñada y alta en la preñada. Se prefiere la leche a la sangre, en especial porque las concentraciones de progesterona son considerablemente mayores en ella que en el plasma. También porque las muestras pueden colectarse durante la ordeña sin causar gran malestar o dolor al animal (Jainudeen y Hafez 2000).

- **Sulfato de Estrona:** Es el principal estrógeno generado por el embrión y puede medirse en plasma, leche u orina maternos en todas las especies domésticas. En la cabra es detectable en leche o plasma entre los días 40 y 50 de gestación (Jainudeen y Hafez 2000).

3.4.3 Técnicas clínicas

En estas técnicas existe detección del embrión, membranas o líquidos fetales.

- **Exploración Rectal:** Debido a la pequeñez de su cavidad pélvica, la cabra no es apta para la exploración rectal del contenido uterino (Jainudeen y Hafez 2000).
- **Radiografía:** Técnica que sólo es aplicable en el último tercio de gestación. Se basa en la identificación del esqueleto fetal en una placa de rayos X. En ovejas, se ha diagnosticado preñez y la determinación del número de fetos con una exactitud del 100 y 90% respectivamente, a partir de los 70 días de gestación. Es una técnica rápida, pero el costo del equipo y el conocimiento del operario limitan su uso (Karen y col 2001).
- **Ultrasonografía:** Medio diagnóstico basado en las imágenes obtenidas por ultrasonido mediante el procesamiento de ecos reflejados de las estructuras corporales. Esta técnica permite lograr un diagnóstico de preñez precoz de manera inocua y no invasiva (Saelzer 1989).

3.5 MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA

En la cabra, la concentración de progesterona sanguínea durante el período de estro normalmente es inferior a 1 ng/ml, después de la ovulación se incrementa paulatinamente hasta alcanzar una concentración mayor a 5 ng/ml a partir del día 10 del ciclo, este nivel se mantiene hasta que la prostaglandina F_{2α} provoca la luteolisis, lo cual ocurre en el día 17 aproximadamente (Chemineau y col 1982).

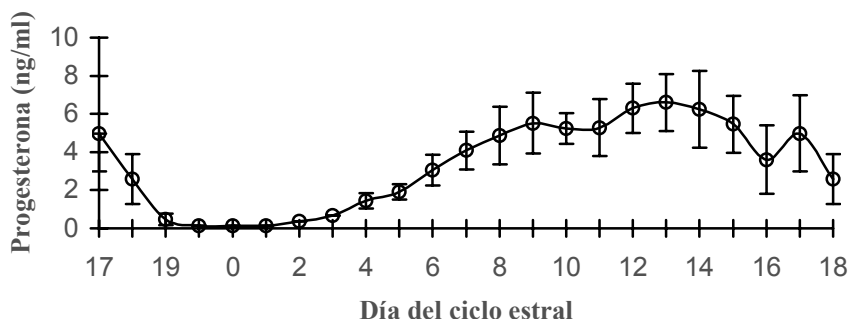


Figura 1: Concentración de progesterona durante el ciclo estral de la cabra Alpina Francesa. Día 0= pulso preovulatorio de la hormona luteinizante (Chemineau y col 1982).

La concentración de progesterona al inicio de la gestación es similar a lo que ocurre al principio del ciclo estral, se incrementa paulatinamente hasta el día 8, pero posteriormente permanece elevada durante toda la gestación. Esta hormona es esencial para el mantenimiento de la preñez, su reducción por cualquier motivo provoca el aborto. La progesterona también se produce en la placenta, pero la fuente principal de esta hormona en la cabra es el cuerpo lúteo (Jainudeen y Hafez 2000 y Bonilla 2001).

Para la medición de las concentraciones de progesterona se dispone de radioinmunoanálisis e inmunoensayos enzimáticos.

- **Técnica de radioinmunoanálisis (RIA):** Es un radioinmunoanálisis de fase sólida donde la progesterona marcada con I^{125} compite por un tiempo fijo con progesterona de la muestra por sitios de unión al anticuerpo. Debido a que el anticuerpo está inmovilizado en la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar con la competencia y aislar la fracción unida al anticuerpo de la progesterona marcada. La lectura se realiza en un contador gamma, el que proporciona un número que se convierte por medio de un curva de calibración, en una medida de la progesterona presente en la muestra del animal.
- **Inmunoensayos enzimáticos:** Actualmente, existen kits o estuches comerciales para la determinación de progesterona en plasma, suero o leche basados en enzima inmunoanálisis (EIA) o en aglutinación de latex (LA).

La técnica de EIA se desarrolló como una alternativa a RIA para la detección de anticuerpos y antígenos en fluidos corporales. La mayoría de los análisis inmunoenzimáticos para esteroides usan métodos de separación entre el conjugado y la fracción libre, que consumen considerable tiempo y reactivos, debido al requerimiento de varios pasos del lavado y centrifugación. Por estos problemas y los asociados con el manejo de material radioactivo, se desarrolló el sistema de EIA para progesterona (Leyva-Ocariz y Munro 1998).

El principio de estos ensayos se basa en la competencia de progesterona no marcada presente en las muestras con una cantidad fija de progesterona marcada con una enzima como fosfatasa alcalina (AP), por la unión a los anticuerpos a progesterona presentes. La cantidad de progesterona marcada ligada a los anticuerpos es inversamente proporcional a la concentración de progesterona no marcada presente en la muestra. La progesterona marcada es activada por el sustrato (un reactivo a la enzima). En EIA cualitativo el color producido es medido visualmente comparando los colores entre las muestras y los estándares. Mientras que en EIA cuantitativo el color producido es medido espectrofotométricamente obteniéndose su densidad óptica y las concentraciones de progesterona determinadas por una curva estándar.

La concentración de progesterona en plasma o suero usado para discriminar entre preñez y no preñez varía según los distintos estudios, siendo de 1 ng/ml (Corteel y col 1987), 1,5 ng/ml (De Montigny y col 1982 y Humblot y col 1990), o de 2 ng/ml (Engeland y col 1997). De esta forma, valores iguales o superiores a 2 ng/ml indicarían preñez y niveles entre 1 y 2 ng/ml generan resultados inciertos o dudosos (Matsas 1997).

A su vez, las concentraciones de progesterona en leche para discriminar entre preñez y no preñez, según algunos estudios, consideran como resultado positivo valores iguales o superiores a 10 ng/ml (Holdsworth y Davies 1979 y Thibier y col 1981) y niveles entre 5 y 10 ng/ml resultados inciertos (Dionysius 1991). Aunque estos valores pueden variar según el tipo de muestra de leche obtenida, donde en leche entera estos niveles son superiores, considerando como resultados positivos de preñez a valores superiores a 30 ng/ml (Murray y Newstead 1988).

Una elevada concentración de progesterona no necesariamente indica preñez, pudiendo encontrar falsos positivos en cabras con una duración de su ciclo estral mayor de lo normal, por muerte embrionaria temprana, hidrometra o piometra (Pieterse y Taverne 1986). La exactitud en la predicción de preñez ha variado en los ensayos de RIA entre 85-92% (Thibier y col 1981 y Leiva-Ocariz y Munro 1998) y en EIA entre 82-93% (Murray y Newstead 1988, Dionysius 1991, Borela y col 1993 y Engeland y col 1997). Al contrario, la exactitud de no preñez es de 100%, debido a que las cabras con bajo contenido de progesterona no podrían estar grávidas (Freitas y Simplicio 1999 y Jainudeen y Hafez 2000).

3.6 ULTRASONOGRAFÍA O ECOGRAFÍA

Es una técnica que permite observar la viabilidad fetal, número de fetos, calcular la edad gestacional, sexo fetal y detectar aspectos clínicos de importancia, como muerte embrionaria, hidrometra o piometra (Bellenda 2003).

Las ondas de ultrasonido son inaudibles para el oído humano y operan a frecuencias de 1 a 10 megahertz (Mhz). El transductor debe ser cómodo de manipular y que sus frecuencias permitan trabajar con una buena relación de profundidad y calidad de imagen. Los de baja frecuencia (3 a 3,5 Mhz) penetran más y permiten visualizar tejidos más profundos que los de altas frecuencias (5 a 7,5 Mhz), con menor penetración en los tejidos, pero con mejor resolución de imagen (Bellenda 2003). En la actualidad se utilizan dos tipos:

- **Modo Doppler:** Consiste en un transductor y un amplificador. Las ondas sonoras inciden en un objeto en movimiento y se reflejan hacia la fuente transmisora a una frecuencia ligeramente distinta, donde son convertidas en sonido audible y amplificadas. Detecta el latido cardiaco fetal, los movimientos fetales, pulso fetal o flujo sanguíneo de las arterias uterinas medias (Goel y Agrawal 1992 y Matsas 1997). Puede ser utilizado transrectalmente con una precisión aceptable entre los días 35 y 40 de gestación (Matsas 1997).

- **Ultrasonografía en modo B:** Es reconocida actualmente como una de las técnicas más completas en la detección temprana de preñez (Matsas 1997). Produce una imagen bidimensional exacta de cortes transversales de los tejidos blandos de tiempo real. El mecanismo utiliza ondas de ultrasonido que son emitidos a través de cristales piezoeléctricos que penetran los tejidos, son devueltos como ecos, los cuales son captados por el mismo cristal y transformados en la pantalla en puntos de brillo. Cada tejido se denomina hiper, hipo o anecogénico, según la cantidad de ecos que reflejan. Se presentan en una escala de grises, desde el negro (anecogénico) como vejiga urinaria, vesícula embrionaria y líquidos fetales, hasta el blanco (hiperecogénico) como el esqueleto fetal (Bellenda 2003).

El diagnóstico de preñez temprano a través de ultrasonografía se basa en la visualización de fluidos en el lumen uterino en forma de áreas anecogénicas redondas o elongadas, correspondientes a la vesícula embrionaria, confirmado por la observación del embrión, en forma de una estructura de ecogenicidad media en el interior de la vesícula anecogénica y su latido cardiaco apreciado como una fibrilación rítmica en el embrión (Buckrell 1988, Goel y Agrawal 1992, Bretzlaff y col 1993 y Matsas 1997). En la cabra se utilizan dos métodos:

- **Ecografía transrectal:** Técnica sencilla y precoz, donde los animales en estudio deben tener a lo menos 12 horas de ayuno. Se debe emplear un transductor de alta frecuencia (5 a 7,5 Mhz). Según algunos autores se puede detectar preñez en cabras a partir del día 16 post cubierta (Matsas 1997 y Bellenda 2003), mientras que otros señalan que a partir del día 24 de gestación, aunque el momento de visualización del embrión y latido cardiaco es alrededor del día 30 de preñez (Buckrell 1988 y Bretzlaff y col 1993).
- **Ecografía transabdominal:** Técnica menos precoz y más simple que la ecografía transrectal. La onda ultrasonográfica debe atravesar una mayor distancia y mayor número de capas, por lo que se utiliza un transductor de menor frecuencia (3,5 Mhz) y por ende mayor penetración. Éste se ubica en la región inguinal de la cabra, por delante y arriba de la inserción mamaria (Bellenda 2003). Se señala que esta ecografía se puede realizar a partir del día 28 de gestación, con una exactitud superior al 80% y que el momento ideal es entre los días 40 a 75 de gestación, cuando el útero grávido descansa sobre la pared abdominal derecha (Bretzlaff y col 1993 y Matsas 1997).

Si bien, la ultrasonografía es actualmente el método más exacto y completo para el diagnóstico de gestación, puede presentar en menor medida diagnósticos falsos positivos por factores como mortalidad embrionaria o hidrometra, o diagnósticos falsos negativos producto de interposiciones como fluidos, gases intestinales o fecas entre transductor y pared rectal (Buckrell 1988, Saelzer 1989 y Freitas y Simplício 1999).

3.7 HIPÓTESIS

- Es posible diagnosticar gestación (no gestación) en cabras mediante la determinación de progesterona en leche por EIA a los 21 días post cubierta.
- El diagnóstico de gestación temprana en cabras por EIA es tan confiable como por RIA y ultrasonografía.

3.8 OBJETIVOS

- Conocer los valores de progesterona en leche entera de cabras durante el estro y al día 10 de la fase luteal.
- Hacer un diagnóstico de gestación mediante el uso de EIA para determinar progesterona en leche entera.
- Confirmar el diagnóstico de gestación (no gestación) efectuado por EIA a través de RIA y Ultrasonografía.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Predio

El estudio se realizó en el plantel caprino “CHEVRITA”, ubicado en las cercanías de Colina, a 40 km. al norte de Santiago, latitud 33° 12' S y longitud 70° 43' O.



Figura 2: Mapa de zona central de Chile.

4.1.2 Animales

Se utilizó 20 cabras clínicamente sanas e identificadas, mestizas con predominio de la raza Saanen en un 85% y el 15% restante entre Criollas, Alpinas y Anglo Nubian, con edades entre 2 y 5 años con un promedio de 3,4 años, una producción promedio de 2,9 litros diarios, de 1 a 3 partos y con 5 a 6 meses de lactancia (Anexo 1).

El manejo de las cabras en estudio consideró todas las directrices y normas de Bienestar Animal establecidas por la Unión Europea y la OIE (Citado por Godoy 2004).



Figura 3: Cabras mestizas con predominio Saanen usadas en la experimentación.

Las cabras fueron sincronizadas mediante manejo hormonal utilizando el protocolo francés de sincronización y cubiertas (Capri-IA) descrito en Cuadro 2.

Cuadro 2: Protocolo de sincronización y cubierta de cabras empleado en este estudio.

ACTIVIDAD	MATERIAL	DOSIS	FECHA	HORA
POSTURA ESPONJAS VAGINALES	Chrono-gest (Intervet)	45 mg Cronolona (acetato de fluorogestona)	09/03/05	10:00
INYECCION eCG	Folligon (Intervet)	700 UI de gonadotropina sérica vía IM (dosis 2 ml)	18/03/05	16:30
INYECCION PGF _{2α}	Lutalyse (Pharmacia)	5 mg de prostaglandina vía IM (dosis 1 ml)	18/03/05	16:30
RETIRO ESPONJAS			20/03/05	16:30
DETECCION CELO AM			21/03/05	11:00
DETECCION CELO PM			21/03/05	14:00
CUBIERTA			21/03/05	16 - 19:30

Como se señala en el Cuadro 2, a las cabras se les introdujo una esponja vaginal por 11 días para aumentar sus concentraciones de progesterona, 2 días antes de su retiro se les inyectó: a) PGF_{2α} para provocar la luteolisis y de esta forma iniciar su ciclo estral y b) eCG para potenciar la expresión del estro y aumentar la tasa ovulatoria. 12 a 24 horas después del retiro de las esponjas se les detectó celo y 6 horas después se cubrieron por monta dirigida.

4.1.3 Determinación de progesterona por EIA

Determinación cualitativa de progesterona en leche de cabras usando un kit de EIA diseñado para suero y plasma de perras y gatas, Ovucheck PREMATE 10, laboratorio Biovet, Canadá. Este kit contiene 2 estándares de progesterona (bajo 3 ng/ml y alto 10 ng/ml), conjugado (progesterona marcada con enzima fosfatasa alcalina), sustrato y tampón sustrato (activador de enzima), 32 micropocillos, 32 pipetas de plástico y un gotario.



Figura 4: Kit Ovucheck Premate 10 laboratorio Biovet

Determinación cuantitativa de progesterona en leche de cabras mediante un kit de EIA diseñado para leche de vacas, Ovucheck Milk, laboratorio Biovet, Canadá. Este kit contiene una microplaca con 96 pocillos con anticuerpo a progesterona, 4 estándares de progesterona (de 1, 5, 10 y 30 ng/ml), conjugado, sustrato y tampón sustrato, solución stop. Además, se requirió de los siguientes materiales: micropipeta, puntillas desechables, agua y equipo lector para ELISA con filtro de 405 nm.

4.1.4 Determinación de progesterona por RIA

Kit coat-a-count progesterona DPC, compuesto por tubos de polipropileno recubiertos con anticuerpos a progesterona (TPG1), progesterona marcada con I^{125} (TPG2), curva estándar con valores de 0; 2,5; 5; 10; 20; 40 y 80 nmol/l. Además, se requirió de un contador gamma, vortex, micropipetas, puntillas desechables y guantes.

4.1.5 Ultrasonografía

Ecógrafo marca MEDISON, modelo Sonoace 88P.

Transductor marca MEDISON de 5 MHz.

Además, se requirió de gel para ecógrafo, vaselina líquida y toallas desechables

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Muestras de leche

Para determinar la concentración de progesterona se obtuvo muestras de 20 ml de leche en la ordeña de la mañana (08:00 AM) en las siguientes fases:

- M1: día siguiente de la cubierta “valor estral”
- M2: día 10 post cubierta “valor luteal”
- M3: día 21 post cubierta “diagnóstico de preñez”

En la determinación cualitativa de progesterona por EIA se utilizó leche entera fresca y en el estudio cuantitativo a la leche entera se le adicionó como preservante azida de sodio (8 mg/muestra, laboratorio MERCK) y se refrigeró a 4 °C. Para el estudio con RIA la leche fue centrifugada por 15 minutos a 3.000 r.p.m., descremada y congelada.

Para estimar el efecto del preservante en el ensayo con EIA también se tomó muestras de leche entera sin preservante y se mantuvieron refrigeradas a 4°C.

4.2.2 Determinación cualitativa de progesterona por EIA

Este kit se empleó en terreno, minutos después de obtenidas las muestras. La distribución de los 32 pocillos del kit fue: estándar A, estándar B, 5 muestras para M1, 5 muestras para M2 y 20 muestras para M3.

Se puso una gota del estándar A (baja progesterona) en el primer pocillo, una gota del estándar B (alta progesterona) en el segundo pocillo y una gota de cada muestra de leche, previamente homogeneizada, en los pocillos siguientes. Posteriormente se adicionó 4 gotas del conjugado a cada pocillo, se cubrió la placa y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente. Después, se vació el contenido de los pocillos y se lavó delicadamente 3 veces con agua de la llave y se secó sobre papel absorbente. Luego se adicionó 4 gotas de preparación sustrato en cada pocillo, se cubrió y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los pocillos se agitaron suavemente para mezclar los contenidos y se compararon los colores entre las muestras y los estándares para interpretar los resultados, siendo la coloración del estándar A de un rosa intenso y la del estándar B amarillo pálido con una leve tonalidad rosa.

Se consideró como diagnóstico positivo de preñez a las muestras M3 que presentaron coloración amarillo pálido, similares a lo obtenido en M2 y al estándar B.

Se consideró como diagnóstico negativo de preñez, a las muestras M3 que presentaron coloración rosa intensa similar a las obtenidas en M1 y al estándar A.

Se consideró como diagnóstico dudoso de preñez, a las muestras M3 que presentaron una coloración intermedia o distinta a las mencionadas anteriormente.

4.2.3 Determinación cuantitativa de progesterona por EIA

Este ensayo se realizó en el laboratorio del Instituto de Microbiología de la Universidad Austral de Chile en un equipo lector para ELISA. La distribución de los 96 pocillos de la microplaca fue: los 4 estándares con duplicado, 24 muestras M1 (20 con preservante y 4 sin preservante), 24 muestras M2 (20 con preservante y 4 sin preservante), 20 muestras M3 cada una con duplicado.

Se adicionó 10 μ l de cada estándar y 10 μ l de cada muestra de leche en los pocillos correspondientes previamente homogeneizada, luego se añadió 200 μ l de conjugado a cada pocillo, se cubrió con una hoja limpia y se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente (23 ± 2 °C). Posteriormente, se vaciaron los pocillos y se lavaron con agua de llave tibia, repitiéndolo dos veces más y se secaron sobre papel absorbente. Luego se agregó 200 μ l de preparación sustrato a cada pocillo, se cubrió con una hoja limpia y se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionó 100 μ l de solución stop a cada pocillo y se procedió a leer la microplaca.

Se leyó la densidad óptica de cada muestra y estándares y con estos resultados se construyó una curva logarítmica $y = 1,27 - 0,23 \ln(x)$, con una correlación de $r = -0,99$, lo que refleja que la relación entre densidad óptica y concentración de progesterona es inversamente proporcional y con un alto grado de asociación entre ellas.

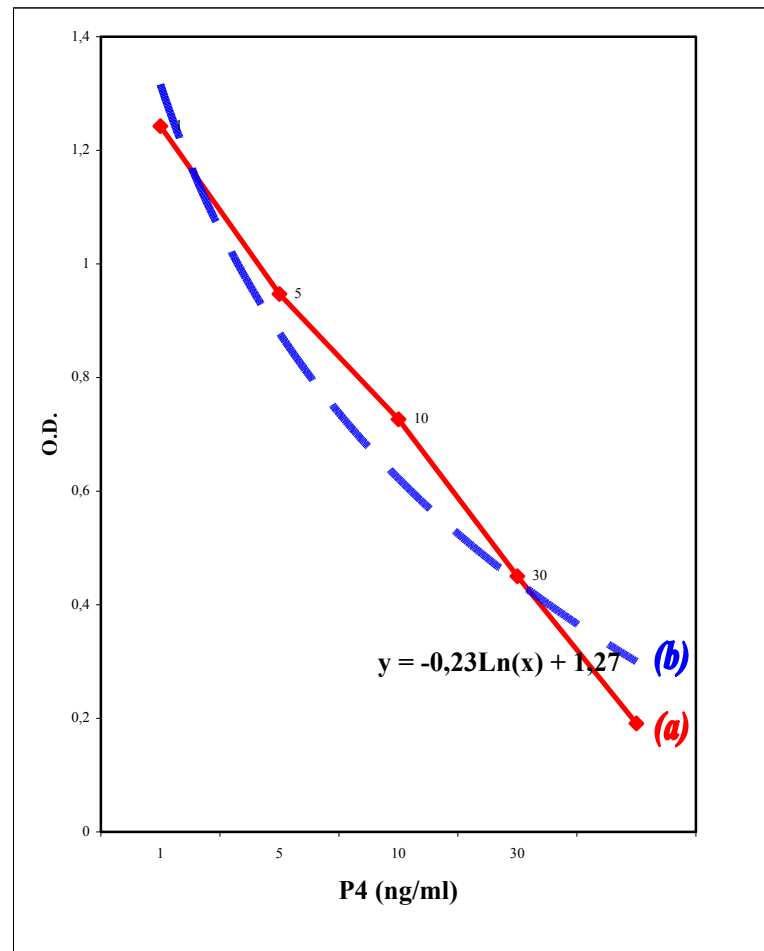


Figura 5: (a) Línea formada por los puntos obtenidos entre los estándares del kit (1, 5, 10 y 30 ng/ml) y su densidad óptica. (b) Curva estándar extrapolada de los estándares del kit.

Finalmente, se determinó las concentraciones de progesterona para cada muestra y los promedios de M1 y M2.

Se consideró como indicador de preñez a los valores de M3 que se asemejaron al valor promedio de las concentraciones de progesterona para M2: $M3 \geq \text{prom. M2} - 2*DE$.

Se consideró como indicador de no preñez a los valores de M3 que se asemejaron al valor promedio de las concentraciones de progesterona para M1: $M3 \leq \text{prom. M1} - 2*DE$.

Se consideró como diagnóstico dudoso a los valores de M3 que fueron intermedios entre los valores promedios obtenidos en M1 y M2.

4.2.4 Determinación de progesterona por RIA

Este ensayo se realizó en el laboratorio del Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile en un equipo de radioinmunoanálisis. Se utilizó 60 tubos de ensayo distribuidos en 20 tubos para M1, 20 para M2 y 20 para M3. Además, se utilizó 7 tubos para procesar la curva estándar a progesterona en leche con valores conocidos de progesterona de 0; 2,5; 5; 10; 20; 40 y 80 nmol/Lt.

Se agregó a cada tubo recubierto con anticuerpos a progesterona 100 μ l de muestra de leche y 1 ml de I^{125} progesterona, se agitó en vortex y se dejó incubar por 3 horas a temperatura ambiente. Luego se decantaron los tubos y se dejaron escurriendo por 3 minutos. Finalmente, se procedió a su lectura en un contador gamma durante 50 segundos por muestra.



Figura 6: Realización del ensayo de RIA en el laboratorio del Instituto de Reproducción Animal.

Con la lectura de los valores conocidos de progesterona se construyó una curva logarítmica que dio como resultado $y = 72,3 - 14,27 \ln(x)$, con una correlación de $r = -0,98$. Posteriormente, se determinó las concentraciones de progesterona para cada muestra y los valores promedios de M1 y M2 expresados en nmol/L y convertidos a ng/ml (1 ng/ml = 3,25 nmol/L).

Se consideró como indicador de preñez a los valores de M3 que se asemejaron al valor promedio de las concentraciones de progesterona para M2: $M3 \geq \text{prom. M2} - 2*DE$.

Se consideró como indicador de no preñez a los valores de M3 que se asemejaron al valor promedio de las concentraciones de progesterona para M1: $M3 \leq \text{prom. M1} - 2*DE$.

Se consideró como diagnóstico dudoso a los valores de M3 que fueron intermedios entre los valores promedios obtenidos en M1 y M2.

4.2.5 Ultrasonografía

El examen por ultrasonografía se realizó vía transrectal los días 21 y 53 post cubierta, siendo en esta última fecha la forma de verificación (o no) de preñez para este estudio.

La ultrasonografía se realizó introduciendo el transductor por el recto, previamente lubricado con vaselina líquida. Se ubicó la vejiga urinaria como referencia, por su estructura anecogénica con bordes bien delimitados y de tamaño variable según el grado de repleción, y se examinaron los cuernos uterinos en ubicación ventral a la vejiga urinaria.

Se consideró como diagnóstico positivo de preñez la visualización de la vesícula embrionaria caracterizada por dilataciones anecogénicas de luz uterina, identificación del embrión caracterizado por una estructura ecogénica de tamaño variable dentro de la luz uterina y la distinción del latido cardiaco, observado como una fibrilación rítmica en el embrión.

Se consideró como diagnóstico negativo de preñez cuando no se apreciaron las estructuras antes mencionadas.

Se consideró como diagnóstico dudoso de preñez cuando se apreciaron signos poco claros, sin movimiento, falta de nitidez o interferencias.

4.2.6 Análisis de resultados

Los resultados fueron analizados por medio de estadística descriptiva. Se construyó una curva estándar por medio de análisis de regresión logarítmica empleando programa Excel 97. Para determinar las diferencias de medias se usó prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales en programa Statistix 8: analytical software 2003. Además, se obtuvo parámetros tales como promedios, rangos y desviación estándar de los niveles de progesterona en leche de cabras.

5. RESULTADOS

5.1 EIA CUALITATIVO

Cuadro 3: Muestras empleadas en cabras para la determinación cualitativa de progesterona en fase estral (M1), fase luteal (M2) y probable gestación (M3).

Muestras	n	Negativos A (color rosa intenso)	Positivos B (color amarillo pálido)
M1	5	5	–
M2	5	–	5
M3	20	–	20

Tal como se aprecia en el Cuadro 3 en la fase estral (M1) las muestras de leche arrojaron una coloración rosa intensa equivalente a la obtenida en el estándar A, estableciendo que son iguales o menores a 3 ng/ml.

En la fase luteal (M2) las muestras de leche presentaron una coloración amarillo pálido similar a lo obtenido en el estándar B (progesterona alta), aunque esta última presentó una coloración amarilla con una leve tonalidad rosa, por lo que cualitativamente se estableció que las muestras son superiores a 10 ng/ml.

En M3, las muestras mostraron una coloración amarillo pálido equivalentes a las obtenidas en la fase luteal (M2). Con estos resultados se estableció que las 20 cabras estudiadas se encontrarían preñadas, ya que sus niveles de progesterona encontrados al día 21 post cubierta fueron elevados y similares a los niveles encontrados en la fase luteal.



Figura 7: Evidencia mostrativa del kit de EIA cualitativo. Primer pocillo corresponde a estándar **A**, segundo pocillo a estándar **B** y los siguientes a las muestras de leche obtenidos a los 21 días post cubierta (M3).

5.2 EIA CUANTITATIVO

Cuadro 4: Concentración de progesterona obtenidos por EIA cuantitativo en fase estral (M1), fase luteal (M2) y probable gestación (M3) expresados en ng/ml.

Muestras	n	Prom.	Rangos	DE
M1				
• c/ preservante	20	13,0 ^a	0,8 – 64,1	18,1
• s/ preservante	4	1,8 ^b	1,0 – 3,1	0,9
M2				
• c/ preservante	20	91,7 ^c	62,8 – 112,7	13,1
• s/ preservante	4	94,2 ^d	80,4 – 104,4	11,9
M3	20	91,5	77,1 – 103,5	8,7

a – b señalan diferencia $P < 0,01$ entre muestras con y sin preservante; c – d no señalan diferencia $P < 0,72$ entre muestras con y sin preservante.

Según el Cuadro 4 en la fase estral (M1) se obtuvo un promedio y DE en las concentraciones de progesterona de $13 \pm 18,1$ ng/ml con rangos de 0,8 y 64,1 ng/ml en las muestras de leche con preservante, mientras que en las muestras sin preservante el promedio y DE fue de $1,8 \pm 0,9$ ng/ml con un rango de 1,0 y 3,1 ng/ml, existiendo diferencia significativa entre estos valores ($P < 0,01$).

En la fase luteal (M2) se obtuvo un promedio y DE en las concentraciones de progesterona de $91,7 \pm 13,1$ ng/ml con rangos de 62,8 y 112,7 ng/ml en las muestras con preservante, y en las muestras sin preservante el promedio y DE fue de $94,2 \pm 11,9$ ng/ml con un rango de 80,4 y 104,4 ng/ml, sin presentar diferencia significativa entre ellas ($P < 0,72$).

Según lo señalado en Cuadro 4, en M3 los valores fluctuaron entre 77,1 y 103,5 ng/ml con un promedio y DE de $91,5 \pm 8,7$ ng/ml, cada una de las muestras se asemejó al valor promedio de la fase luteal (M2) de 91,7 ng/ml, siendo superior a 65,5 ng/ml (prom. M2 - $2*DE$), por lo que se consideró diagnóstico positivo de gestación en la totalidad de las cabras en estudio.

5.3 RIA

Cuadro 5: Concentración de progesterona obtenidos en leche desgrasada por RIA en fase estral (M1), fase luteal (M2) y probable gestación (M3) expresados en ng/ml.

Muestras	n	Prom.	Rangos	DE
M1	20	0,4	0 – 1,8	0,6
M2	20	11,7	5,7 – 22,1	4,0
M3	20	9,7	5,8 – 14,2	2,6

En el Cuadro 5 se aprecia la determinación de progesterona mediante RIA, donde en la fase estral (M1) se obtuvo un promedio y DE en los niveles de progesterona de $0,4 \pm 0,6$ ng/ml con rangos de 0 y 1,8 ng/ml, mientras en la fase luteal (M2) el promedio y DE fue de $11,7 \pm 4$ ng/ml con rangos de 5,7 y 22,1 ng/ml.

Como se aprecia en Cuadro 5, en M3 se obtuvo un promedio y DE de $9,7 \pm 2,6$ ng/ml con rangos de 5,8 y 14,2 ng/ml, similar al valor promedio de la fase luteal de 11,7 ng/ml. Cada una de las muestras presentó valores superiores a 3,7 ng/ml (prom. M2 - $2*DE$), por lo que se consideró diagnóstico positivo de gestación en la totalidad de las cabras estudiadas.

5.4 ULTRASONOGRAFÍA

La ultrasonografía a los 21 días post cubierta mostró que 13/20 (65%) de las cabras estaban preñadas, 5/20 (25%) dudosas y 2/20 (10%) indeterminadas. Se observó en las cabras preñadas ventral a la vejiga urinaria la vesícula embrionaria anecogénica y redondeada de aproximadamente 1 cm. de diámetro y con movimiento generado por el latido cardiaco; en las cabras dudosas se apreció una zona anecogénica similar a las anteriores pero sin presentar movimiento, mientras que a las cabras indeterminadas no se les vislumbró vejiga urinaria ni cuernos uterinos.

La ultrasonografía a los 53 días post cubierta confirmó gestación en 20/20 (100%) de las cabras en estudio, observándose ventral a la vejiga urinaria una clara zona anecogénica redondeada y con presencia del feto en su interior como una estructura ecoica, de forma alargada y en la mayoría de los casos ubicada centralmente de unos 4 cm. de diámetro y con presencia de movimiento producto de los latidos cardiacos (Figura 8).



Figura 8: Ecógrafo (Medison) usado para diagnóstico de gestación en cabras a los 53 días. Note en la pantalla presencia de fluido uterino y feto en su interior.

Cuadro 6: Cuadro comparativo de diagnóstico de gestación en cabras mediante la utilización de EIA, RIA y ultrasonografía.

Ensayo	n	Rango (ng/ml)	Diagnóstico de gestación (%)			
			preñez	dudosas	no preñez	indetermin.
EIA cualitativo	20	–	100	0	0	0
EIA cuantitativo	20	77,1 – 103,5	100	0	0	0
RIA	20	5,8 – 14,2	100	0	0	0
Eco 21 días	20	–	65	25	0	10
Eco 53 días	20	–	100	0	0	0

Del Cuadro 6 se establece que el diagnóstico de gestación fue de un 100% (20/20) en todos los ensayos excepto en la ultrasonografía a los 21 días post cubierta con un 65% (13/20). Además, se determinó que las concentraciones de progesterona en leche entera obtenidos por EIA en cabras gestantes fue superior a 77 ng/ml y en leche desgrasada elaborados por RIA fue superior a 5,7 ng/ml.

6. DISCUSIÓN

La determinación de progesterona en leche de cabras, tanto cualitativa como cuantitativamente, funcionó adecuadamente como se puede apreciar en los Cuadros 3 y 4. Se debe hacer notar que el kit de EIA para la determinación cualitativa estaba diseñado por el fabricante para su uso en plasma o suero de perras o gatas y el kit cuantitativo para su uso en leche de bovinos. Estos resultados indican que pueden usarse estos kits en diferentes especies tanto en muestras de sangre como de leche, donde la importancia radica en conocer previamente los valores de progesterona en la especie en estudio para ver si es aplicable en alguno de los kits comerciales de acuerdo a sus estándares. De hecho, Borela y col. (1993) emplearon un kit de EIA para equinos y Murray y Newstead (1988) y Engeland y col. (1997) un kit diseñado para bovinos, para sus estudios en sangre y leche de cabras respectivamente.

Según los resultados del Cuadro 3, el ensayo realizado por EIA cualitativo permitió estimar que el 100% de las cabras estaban preñadas, ya que sus niveles de progesterona fueron elevados y similares a lo encontrado en la fase luteal, con una coloración amarillo pálido. Estos resultados mostraron claramente la diferencia existente entre un valor negativo y uno positivo, permitiendo determinar gestación.

De igual forma los resultados del ensayo realizado por EIA cuantitativo (Cuadro 4), permitieron determinar que todas las concentraciones de progesterona encontrados al día 21 post cubierta fueron elevados y comparables a los valores encontrados en la fase luteal. Estos valores pueden parecer elevados, pero coinciden con aquellos descritos por Murray y Newstead (1988) quienes encontraron promedios en la fase luteal de 70 ng/ml y consideraron preñez en cabras entre los 19 y 22 días post cubierta en concentraciones superiores a 30 ng/ml, estos mismos autores estimaron no preñez en concentraciones inferiores a 4 ng/ml.

El preservante empleado influyó en la lectura de las concentraciones de progesterona en las muestras de la fase periéstral (M1) presentando diferencia significativa ($P < 0,01$) respecto a las muestras sin preservante, mostrando una elevada variabilidad y promedio como se puede apreciar en el Cuadro 4. Sin embargo, este efecto no se observó en la fase luteal cuando las concentraciones de progesterona eran elevadas. Lo anterior se puede deber a la existencia de muestras erráticas o a que el preservante utilizado modifica el espectro del color de las muestras cuando los valores de progesterona son bajos pudiendo alterar sus valores.

En relación a los valores obtenidos en la fase estral observados en el Cuadro 4, puede señalarse que parecen ser más bajos y claros que los descritos por Murray y Newstead (1988) quienes obtuvieron una media de 6,6 ng/ml con un amplio rango de 1,5 a 20 ng/ml.

El día 10 post cubierta como representación de los valores de la fase luteal mostrados en el Cuadro 4, parece una elección adecuada porque sus concentraciones son coincidentes con las descritas por Murray y Newstead (1988) entre los días 10 y 14 del ciclo estral.

En cuanto a la amplitud y variación observada entre este estudio y los de Murray y Newstead (1988) y a los rangos de cada fase, se pueden explicar por el tipo de anticuerpo utilizado, la presencia de otros metabolitos que pueden interferir con el anticuerpo a progesterona empleado, el porcentaje de grasa existente en cada muestra, la función fisiológica de la glándula mamaria especialmente en preñez donde presenta un aumento y el período de lactancia donde al final de ella las concentraciones de progesterona decrecen. De los factores antes mencionados que explican la variación en los valores de progesterona, el que resulta de mayor importancia es el porcentaje de grasa existente. Engeland y col. (1997) señalan que los valores tan altos de progesterona encontrados en muestras de leche entera se deben a su porcentaje de grasa afectando sus concentraciones. De Montigny y col. (1982) determinaron progesterona en leche y en grasa obteniendo para el primero valores promedios de 3,5 ng/ml en la fase estral y de 26,4 ng/ml en la fase luteal mientras que en grasa estos valores alcanzaron promedios de 21,6 ng/ml y de 437 ng/ml respectivamente. El mismo estudio estableció valores en cabras preñadas de 16 ng/ml en las muestras de leche y de 238 ng/ml en grasa. De esta forma se confirmó la influencia de la grasa en los valores de progesterona y también que es totalmente factible diagnosticar gestación ya sea en muestras de leche o grasa por el claro aumento de sus valores respecto a la fase estral.

El ensayo de RIA para la determinación de progesterona (Cuadro 5) confirmó valores bajos en la fase estral y altos en la fase luteal. Estos resultados son coincidentes con aquellos descritos por Thibier y col. (1981), Leiva-Ocariz y Munro (1998) y San Martín (2001). De igual manera los valores obtenidos a los 21 días post cubierta (M3) permitieron considerar al 100% de las cabras preñadas, lo que confirma los resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos por EIA.

En cambio, la ultrasonografía realizada a los 21 días post cubierta sólo permitió estimar preñez en el 65% (13/20) de los animales muestreados. Este resultado plantea una duda: o las estimaciones por EIA y RIA están equivocadas o la ecografía empleada en esta fecha presenta algún problema. Los resultados obtenidos por ultrasonografía a los 53 días post cubierta confirmaron que el 100% de las cabras estaban preñadas, ratificando el diagnóstico por EIA y RIA y estableciendo que el inconveniente estuvo en el diagnóstico ecográfico practicado a los 21 días post cubierta. Como posible explicación a este bajo porcentaje de preñez es la influencia del operario, donde se requiere de personal con experiencia y conocimientos (ver Anexo 2), sin embargo estudios señalan que si bien se ha descrito que es posible determinar gestación en cabras a partir del día 15 post cubierta (Bretzlaff y col 1993) el embrión frecuentemente no se puede determinar antes de los 24 días (Matsas 1997). Por lo tanto, la fecha límite para determinar gestación sería el día 24, aunque Buckrell (1988) señaló que el embrión y latido cardíaco pueden visualizarse con certeza a partir de los 30 días. Esto difiere de lo reportado por Santiago y col. (1995) quienes determinaron que la imagen del embrión y el parpadeo cardíaco se detectan con nitidez en el día 16 post cubierta; sin embargo, conviene señalar que estos últimos autores utilizaron un transductor de 7,5 MHz que es más sensible que el transductor de 5 MHz empleado en este estudio y los anteriormente mencionados.

La ecografía realizada a los 53 días post cubierta confirmó los resultados obtenidos a los 21 días mediante EIA y RIA; esta segunda ultrasonografía pudo haberse efectuado más temprano como lo señalan Buckrell (1988), Bretzlaff y col. (1993) y Engeland y col. (1997) donde a partir del día 40 el diagnóstico de gestación es 100%, apreciándose claramente fluido uterino, placentomas, feto y movimientos fetales.

El hecho de que el 100% (20/20) de las cabras en este estudio estuviesen realmente preñadas al día 53 post cubierta es excepcionalmente alto. Esta alta tasa de gestación se debe al manejo reproductivo empleado, en el cual se examinó a todas las cabras y se eligió a 20 clínicamente sanas, sincronizadas adecuadamente, y cubiertas por medio de monta dirigida. Conviene hacer notar que Murray y Newstead (1988) diagnosticaron preñez por EIA en el 82% (53/66), Dionysius (1991) en el 88,9% (9/8), Borela y col. (1993) en el 93,3% (14/15) y Engeland y col. (1997) en el 82% (57/47). Esta diferencia de exactitud en el diagnóstico de progesterona se puede deber a que en los días 18 a 24 post cubierta sólo se confirma la presencia de un cuerpo lúteo activo, el que puede persistir, además de preñez, por otras causas tales como metritis o cuadros más severos de hidrómetra o piometra. Por el contrario, valores bajos de progesterona señalan que no hay actividad luteal y por ende en un 100% no puede haber gestación, siendo un test de 100% de efectividad como diagnóstico de no preñez (Freitas y Simplicio 1999 y Jainudeen y Hafez 2000).

Otro punto a considerar en este trabajo es que no hubo mortalidad embrionaria, un factor que puede disminuir el valor diagnóstico realizado a los 21 días post cubierta. Dionysius (1991) y Engeland y col. (1997) diagnosticaron preñez temprana, pero verificaron posteriormente algunas cabras como no preñadas mediante ultrasonografía (a partir de los 50 días) o porque no parieron. Para Bretzlaff y col. (1993) el porcentaje de muerte embrionaria o pérdida fetal varía según la raza, nutrición y principalmente por estrés y según su experiencia es entre 2 y 8%, mientras que Boscos y col. (2003) plantean que estas pérdidas pueden llegar al 25%.

Finalmente, puede señalarse que el kit de EIA para determinación cualitativa de progesterona se empleó en terreno, junto a las cabras, sin necesidad de un laboratorio ni instrumental o maquinaria específica y sus resultados se obtuvieron en menos de una hora desde que se tomó las muestras. Todas estas características le dan una ventaja a este método sobre el kit cuantitativo que requirió de un laboratorio con equipo lector para ELISA tardando más de 90 minutos en obtener la densidad óptica y por RIA que necesitó un laboratorio y equipo especializado por tratarse de material radioactivo tardando más de 5 horas en conseguir los valores de las muestras. Por lo tanto, esta técnica podría incorporarse como una nueva herramienta al manejo reproductivo caprino.

CONCLUSIONES

- La detección de progesterona en leche entera, tanto por EIA cualitativo como cuantitativo, permitió diagnosticar gestación en cabras a los 21 días post cubierta.
- La determinación de progesterona por RIA y la ultrasonografía empleada a los 53 días post cubierta permitieron confirmar en un 100% los resultados cualitativos y cuantitativos obtenidos por EIA.
- Las concentraciones de progesterona en leche entera fueron inferior a 4 ng/ml en la fase estral y superior a 60 ng/ml en la fase luteal.

PROYECCIONES DEL TRABAJO

Proporcionar una herramienta de diagnóstico de gestación temprana a los productores de leche de cabra y otras especies menores, que se realice en terreno, en forma indolora, simple, rápida y a un costo relativamente bajo (ver Anexo 2).

7. BIBLIOGRAFÍA

Bellenda O. 2003. La ecografía aplicada a la reproducción en especies de interés productivo. Pro Agro, Uruguay. 9 p.

Bonilla A. 2001. Protocolo de investigación: Influencia de la medroxiprogesterona sobre la anovulación de cabras prepuberes. Quintas jornadas de investigación. Universidad Autónoma de Zacatecas. 19 p.

Bonilla W. 2001. Manejo reproductivo de la cabra. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chillán, Chile. Boletín INIA N° 66. 7 p.

Borela C, S Rezende, F Aloizio, M Teixeira, R Linhares. 1993. Eficiência do teste rápido de progesterona no diagnóstico precoce da gestação em cabras. Rev. Soc. Bras. Zoot. 22: 222-226.

Boscós C, F Samartzi, A Lymberopoulos, A Stefanakis, S Belibasaki. 2003. Assessment of progesterone concentration using enzymeimmunoassay, for early pregnancy diagnosis in sheep and goats. Reprod. Dom. Anim. 38: 170-174.

Bretzlaff K, J Edwards, D Forrest, L Nuti. 1993. Ultrasonographic determination of pregnancy in small ruminants. Vet. Med. 88: 12-24.

Buckrell B. 1988. Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. Theriogenology 29: 71-84.

Cofre P. 2001. Producción de cabras lecheras. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. Chillán, Chile. Boletín INIA N° 66. 202 p.

Chemineau y col. 1982. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol 17, and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. En: Bonilla A. (ed). 2001. Influencia de la medroxiprogesterona sobre la anovulación de cabras prepuberes. Quintas jornadas de investigación. Universidad Autónoma de Zacatecas. México.

Corteel J, G Barel, B Leboeuf. 1987. Development and application of Artificial Insemination with deep frozen semen and out of season breeding of goats in France. Proc. 4th Int. Conf. Goats. Brasilia, Brasil: 523-531.

De Montigny G, P Millerioux, N Jeanguyot. 1982. Milk fat progesterone concentrations in goats and early pregnancy diagnosis. Theriogenology 17: 423-432.

Deveson S, J Arendt, I Forsyth. 1992. The influence of the pineal gland and melatonin on the reproductive performance of domesticated female ungulates. *Anim. Reprod. Sci.* 30: 113-134.

Dionysius D. 1991. Pregnancy diagnosis in dairy goats and cows using progesterone assay kits. *Aust. Vet.* 68: 14-16.

Engeland I, E Ropstad, O Andresen, L Eik. 1997. Pregnancy diagnosis in dairy goats using progesterone assay kits and oestrous observation. *Anim. Reprod. Sci.* 47: 237-243.

Freitas V, A Simplicio. 1999. Diagnóstico de prenhez em caprinos: uma revisao. *Ciencia Animal.* 9 (2): 51-59.

Godoy L. 2004. Posición y políticas del Colegio Médico Veterinario respecto al bienestar de los animales (BA). Chile: 1-12.

Goel A, K Agrawal. 1992. A review of pregnancy diagnosis techniques in sheep and goats. *Small Rum. Res.* 9: 255-264.

González C. 1998. Desarrollo caprino en la región de Coquimbo: antecedentes y análisis. En: *Caprinos de leche en Chile: situación actual y perspectivas*. FIA, Ministerio de Agricultura, Chile. 1999. 63 p.

Jainudeen M, H Wahid, E Hafez. 2000. Ciclos reproductivos: ovejas y cabras. En Hafez E, B Hafez (ed). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Nueva Editorial Interamericana, 7^o Edición. México: 177 - 187.

Jainudeen M, E Hafez. 2000. Diagnóstico de preñez. En Hafez E, B Hafez (ed). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Nueva Editorial Interamericana, 7^o Edición. México: 405 - 414.

Holdsworth R, J Davies. 1979. Measurement of progesterone in goat milk: an early pregnancy test. *Vet. Rec.* 105: 535

Humblot P, G De Montigny, N Yeanguyot, F Tetedoie, M Payen, M Thibier, R Sasser. 1990. Pregnancy-specific protein β and progesterone concentrations in French Alpine goats throughout gestation. *J. Reprod. Fert.* 89: 205-212.

INE. Instituto Nacional de Estadísticas. 2003. Departamento de Estadística Agropecuaria. Chile.

Ishwar A. 1995. Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. En Freitas V, A Simplicio (ed). 1999. *Diagnóstico de prenhez em caprinos: uma revisao*. *Ciencia Animal.* 9 (2): 51-59.

Karen A, P Kovacs, J Beckers, O Szenci. 2001. Review article pregnancy diagnosis in sheep: review of the most practical methods. *Acta Vet. Brno.* 70: 115-126.

Leyva-Ocariz H, C Munro. 1998. Comparación del uso de RIA y ELISA en la determinación de progesterona en cabras durante el ciclo estral. *Rev. Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Zulia.* 8: 63-67.

Matsas D. 1997. Pregnancy diagnosis in the goat. En: Youngquist R. (ed). *Current therapy in large animal theriogenology.* W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA.: 514-520.

Muñoz B, J Lhorente, V Parraguez. 2000. Diagnóstico precoz de gestación en cabras. *Tecno Vet* 3: Año 6.

Murray R, R Newstead. 1988. Determination of steroid hormones in goats milk and plasma as an aid to pregnancy diagnosis using an ELISA. *Vet. Rec.* 122: 158-161.

Pieterse M, M Taberne. 1986. Hydrometra in goats: Diagnosis with realtime ultrasound and treatment with prostaglandin or oxytocin. *Theriogenology* 26: 813-821.

Saelzer P. 1989. Manejo de gestación y parto. En: *Curso de reproducción e inseminación artificial en caprinos.* FAO – Universidad Austral de Chile.

San Martín C. 2001. Diagnóstico de gestación temprana en cabras criollas mediante determinación de progesterona plasmática y ecografía. *Memoria de titulación,* Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

Santa María A, J Cox, E Muñoz. 1990. Caracterización de la estacionalidad reproductiva y ciclo sexual de caprinos criollos. *Agro Ciencia.* 6: 103-108.

Santiago J, A González, M García, A López. 1995. Valoración de estadios precoces de gestación en oveja y cabra mediante ecografía transrectal. *Invest. Agr: Prod. Sanid. Anim.* 10: 53-61.

Smith M. 1997. Clinical reproductive anatomy and physiology of the doe. En: Youngquist R. (ed). *Current therapy in large animal theriogenology.* W. B. Saunders Company. Philadelphia, USA.: 505-508.

Thibier M, D Pothelet, N Jeanguyot, G De Montigny. 1981. Estrous behavior, progesterone in peripheral plasma and milk in dairy goats at onset of breeding season. *J Dairy Sci* 64: 513-519.

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1

Descripción de las cabras en estudio según: arete, raza, edad (años), partos y producción de leche diaria (en litros).

Número	Arete	Raza	Edad (años)	Nº Partos	Prod. (lt/día)
1	257	Mest. Saanen	5	3	3,8
2	277	Mest. Saanen	5	3	2,9
3	1026	Mest. Saanen	4	2	3
4	1155	Mest. Saanen	4	2	2,6
5	1162	Mest. Saanen	4	2	4,2
6	1179	Mest. Saanen	4	2	2,8
7	1206	Mest. Saanen	4	2	2,9
8	1246	Mest. Saanen	4	2	4,2
9	1332	Mest. Saanen	4	2	2,9
10	2001	Mest. Saanen	3	2	2,8
11	2041	Mest. Saanen	3	2	2,7
12	2065	Mest. Saanen	3	2	2,2
13	2201	Mest. Saanen	3	2	2,4
14	2226	Mest. Saanen	3	2	3,3
15	2245	Mest. Saanen	3	2	2,8
16	2355	Mest. Saanen	3	2	2,5
17	3056	Mest. Saanen	2	1	2,5
18	3072	Mest. Saanen	2	1	2,3
19	3080	Mest. Saanen	2	1	2,5
20	3302	Mest. Saanen	2	1	2,8
Promedio			3,4	1,9	2,9

8.2 ANEXO 2

Cuadro comparativo de los ensayos empleados en este estudio para determinar gestación temprana en cabras.

Items	EIA cualitativo (leche)	EIA cuantitativo (leche)	RIA (leche)	Ultrasonografía
Material	Kit EIA cualit. para P ₄	Kit EIA cuantit. para P ₄	Kit RIA para P ₄	Ecógrafo + transductor
Material adicional	Ninguno	Micropipeta, puntillas, equipo lector ELISA	Contador gamma vortex, micropipeta, puntillas, guantes	Gel ecógrafo, vaselina líquida
Lugar del ensayo	Terreno	Laboratorio con lector ELISA	Laboratorio para material radioactivo con contador gamma	Terreno
Tiempo empleado	< 1 hra.	> 1 ½ hra.	> 5 hra.	1-2 min. por animal
Costo material	US\$ 170	US\$ 170	US\$ 220	Desde US\$ 12.000
Costo por animal	\$ 3.300	\$ 1.100	\$ 1.350	Se requieren min. 2100 ecos para igualar costo EIA
Efectividad en el diagnóstico: - preñez - no preñez	83 – 100% 100%	82 – 100% 100%	85 – 100% 100%	21 días: 65% 30-40 días: >80% >40 días: 100%
Efecto en animal	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Estrés
Inconvenientes del ensayo	Ninguno	Personal calificado	Material radioactivo y personal calificado	Personal con experiencia y conocimientos

8.3 ANEXO 3

Resultados de los niveles de progesterona obtenidos por EIA en fase periestral (M1), fase luteal (M2) y probable gestación (M3) por cabra, expresados en ng/ml.

Cabras	M1 (ng/ml)		M2 (ng/ml)		M3 (ng/ml)
	c/ preserv.	s/ preserv.	c/ preserv.	s/ preserv.	
1	13,1	1,5	97,9	103,9	95,4
2	1,1		102,6		97,9
3	3,2		91,0		102,6
4	0,8		97,5		89,5
5	24,0		69,6		79,1
6	2,4	1,7	72,3	80,4	78,4
7	10,1		70,8		77,1
8	4,2		93,0		93,8
9	4,2		91,4		92,6
10	33,7		112,7		99,1
11	5,3	3,1	100,8	104,4	87,2
12	56,2		98,3		98,7
13	14,2		100,0		102,1
14	64,1		62,8		98,3
15	3,1		96,2		103,5
16	3,0	1,0	84,7	88,0	89,5
17	3,1		93,8		89,9
18	4,2		96,2		79,7
19	3,9		99,1		80,8
20	6,8		103,0		94,6
Prom	13,0	1,8	91,7	94,2	91,5
DE	18,1	0,9	13,1	11,9	8,7

8.4 ANEXO 4

Resultados de los niveles de progesterona obtenidos por RIA en fase periestral (M1), fase luteal (M2) y probable gestación (M3) por cabra, expresados en nmol/lt y ng/ml.

Cabras	M1		M2		M3	
	nmol/lt	ng/ml	nmol/lt	ng/ml	nmol/lt	ng/ml
1	2,3	0,7	28,1	8,6	40,1	12,3
2	0,1	0,0	40,7	12,5	38,9	12,0
3	0,4	0,1	49,9	15,3	29,9	9,2
4	5,5	1,7	46,0	14,2	34,9	10,7
5	1,6	0,5	29,7	9,1	24,2	7,5
6	0,5	0,2	25,5	7,8	18,8	5,8
7	0,3	0,1	18,5	5,7	25,6	7,9
8	0,1	0,0	33,0	10,1	20,8	6,4
9	0,1	0,0	40,8	12,5	25,3	7,8
10	1,4	0,4	37,6	11,6	36,3	11,2
11	0,1	0,0	59,7	18,4	46,2	14,2
12	4,3	1,3	37,8	11,6	43,0	13,2
13	2,0	0,6	50,1	15,4	36,4	11,2
14	5,9	1,8	45,0	13,8	26,8	8,3
15	0,1	0,0	36,3	11,2	33,6	10,4
16	0,3	0,1	27,0	8,3	38,1	11,7
17	0,7	0,2	25,8	7,9	21,6	6,7
18	0,5	0,2	24,0	7,4	25,1	7,7
19	0,7	0,2	35,6	11,0	22,5	6,9
20	0,3	0,1	71,9	22,1	43,9	13,5
Prom.	1,4	0,4	38,1	11,7	31,6	9,7
DE	1,8	0,6	13,1	4,0	8,5	2,6

9. AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas e instituciones que colaboraron en el desarrollo de esta tesis y de manera especial a:

Dr. Jorge Correa, Profesor Patrocinante y Director del Instituto de Reproducción Animal.

Dr. Pedro Saelzer, (ex) Instituto de Reproducción Animal.

Dr. Jorge Rubilar, (ex) Instituto de Reproducción Animal.

Sra. Carmen Schüller, Laboratorio Instituto de Reproducción Animal.

Dra. Ximena Rojas y Dra. Bárbara Otto, Laboratorio Instituto de Microbiología.

Dr. Fernando Wittwer, Laboratorio Hospital Clínico Veterinario.

Dr. Santiago Ernst, Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria.

Sr. Manuel Zamora, Gerente General Empresa Chevrita.

Dra. Estela Cornaglia, R & D Director laboratorio Biovet, Canadá.