DETERMINACIÓN RÁPIDA Y SENCILLA DE PROGESTERONA EN PLASMA DE VACA MEDIANTE ENZIMOINMUNOANÁLISIS EN PLACA

C.BORQUE, J. DE LA FUENTE, C. GONZALEZ STAGNARO y J. GRANADOS
CIT-INIA. Área de Reproducción Animal. Carretera de La Coruña km. 5.9
28040 Madrid.

INTRODUCCIÓN

Entre los problemas más importantes relacionados con la reproducción animal se encuentran la detección del celo, el diagnóstico precoz de gestación y la transferencia de embriones. En los programas MOET en los que se realizan tratamientos de sincronización a grupos de animales receptores de embriones, no siempre resulta sencillo detectar a los que muestran celo. Posteriormente, en el día de la transferencia (7º día del ciclo), el único método disponible actualmente para evaluar su idoneidad, viene dado por la exploración rectal del cuerpo lúteo, la cual sólo aporta una información subjetiva de la morfología del mismo y no de su funcionalidad, por lo que, en ocasiones, la tasa de rechazo de las receptoras puede ser superior al 50%.

Es indudable la importancia práctica de disponer de un método, rápido y fiable, para determinar progesterona que es la hormona que está íntimamente relacionada con estos procesos biológicos.

Dray y col. (1), en 1975, fueron los primeros que aplicaron el enzimoinmunoanálisis (ELISA), para la determinación de progesterona en plasma sanguíneo, método que fue, posteriormente, utilizado por otros investigadores (2,3,4).

Aunque el radioinmunoanálisis (RIA) presenta buena sensibilidad y precisión, la necesidad de utilizar isótopos radiactivos e infraestructura costosa, hace que su utilidad esté limitada a grandes laboratorios. La técnica enzimoinmunoanalítica, que utiliza como marcador una enzima en vez de un isótopo radiactivo, simplifica, en gran medida, la metodología y los requisitos técnicos y legales de los laboratorios, puede llevarse a cabo en la propia explotación sin necesidad de enviar las muestras a centros especializados e incluso no precisa ningún aparato para determinar la diferencia de color entre muestras positivas y negativas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ELISA puesto a punto para determinar progesterona en plasma sanguíneo de vaca, utiliza como soporte placas de microtitulación de poliestireno, con 96 pocillos, que se han *tapizado* con un anticuerpo antiprogesterona purificado.

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena coxígea, mediante vacutainers heparinizados, a vacas que estaban en los días 0, 4 y 7 del ciclo y en el inicio de la pubertad. El plasma se obtuvo por centrifugación de las muestras de sangre a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.

El anticuerpo se ha obtenido en el Área de Reproducción Animal del CIT-INIA de Madrid, mediante inmunización de conejos neozelandeses, según la técnica de Vaitukaitis y col. (5), con un inmunógeno, Progesterona-11α-hemisuccinato-BSA, sintetizado por nosotros, siguiendo el método del anhídrido mixto propuesto por Erlanger y col. (6). La purificación del anticuerpo a IgG se ha llevado a cabo por el sistema de precipitación/dilución.

Para la realización del análisis, se añade a cada pocillo, 50µl de tampón, 50µl de plasma y 50µl de solución de conjugado enzimático (60 ng/ml); tras una agitación de la placa, se incuba 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo, se elimina el líquido de los pocillos y se lavan 5 veces con solución de lavado (Tween 80 al 0.05%).

Posteriormente, se adiciona, a cada pocillo, una solución del sustrato (3,3',5,5'-Tetrametilbencidina/Agua oxigenada) incubándose 45 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se desarrollará un color azul cuya intensidad es inversamente proporcional a la cantidad de progesterona que contenga la muestra. Esta diferencia de color es perfectamente evaluable mediante observación visual, sin necesidad de utilizar un lector de placas de ELISA.

Con el fin de cuantificar los niveles de progesterona y para calcular la correlación con el radioinmunoanálisis, se ha incluido en las placas una curva estándar de 0 a 10 ng/ml de hormona en tampón y en plasma de vaca. Para realizar la cuantificación, la reacción enzimática se frena añadiendo ácido sulfúrico 4N, el color cambia de azul a amarillo, y se mide la densidad óptica (D.O) de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm. El valor de la D.O será inversamente proporcional a la concentración de progesterona de las muestras.

En esta primera fase del trabajo, se ha llevado a cabo: a) Comparación de curvas estándar en tampón y en plasma, por RIA y por ELISA y b) Comparación de resultados visuales y cuantitativos por RIA y por ELISA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este primer paso de puesta a punto del método, se ha realizado:

a) Comparación de curvas estándar en tampón y en plasma por RIA y por ELISA. Se ha observado una buena correlación entre ambas técnicas, r = 0.96 para tampón y r = 0.92 para plasma, lo que hace válido este método enzimoinmunoanalítico para estándares en plasma de vaca.

La separación porcentual entre los puntos más distantes (0 y 10 ng/ml de progesterona) es similar y elevada, RIA 75% y ELISA 78%, lo que indica una perfecta separación de los puntos tanto en RIA como en ELISA. Valores superiores al 50% dan lugar a una diferencia de color suficiente para poder llevar a cabo una evaluación visual. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en plasma de cerda (7,8).

b) Comparación de resultados visuales y cuantitativos por RIA y por ELISA. Se ha observado una elevada coincidencia, 89%, entre las observaciones visuales y las estimaciones cuantitativas de progesterona, tanto si se realizan por ELISA como por RIA.

A la vista de estos resultados y pese a haber analizado todavía un número de muestras poco significativo, la simplicidad del método y los resultados obtenidos en estos estudios preliminares, permiten predecir una fiable y económica utilización de la técnica en condiciones de campo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Dray, F. and Andrieu, J.M.; Biochim. Biophys. Acta. 1975, 403, 131-138.

(2) Joyce, B.J. and Read, G.F.; Steroids. 1977, 29,761-770.

(3) Nakao, T.; Acta Endocrinol. 1980, 93,223-227.

(4) Joyce, B.G. and Wilson, D.W.; Clin. Chem. 1978, 24, 2099-2102.

(5) Vaitukaitis, J. and Robbins, J.B.; Clin. Endocrinol. Metab. 1971, 33, 988.

(6) Erlanger, B.F. and Borek,F.; Methods in Immunology and Immunochemistry. 1967, Vol.1.

(7) Saiz, F. y Borque, C.; Comunicación 9th Congress I.P.V.S. 1986, Barcelona, España.

(8) Saiz, F. y Borque,C.; Comunicación 11th Congress on Animal Reproduction.1988, Dublin.