

## FR 31. COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA vs RIA EN LA DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA PLASMÁTICA SANGUÍNEA DE BOVINOS

Noris Roa<sup>1</sup>, Tiburcio Linares<sup>1</sup>, Morella R. de Rolo<sup>2</sup> y Rita Tamasaukas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Zootécnicas, CENIAP FONAIAP, Ave. Universidad, Apdo. Postal 4653, Maracay 2101, Venezuela. Telefax: 58-43-831655; e-mail: njroa@reacciun.ve. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP FONAIAP. Maracay. Venezuela. <sup>3</sup>Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos. LABIPRESAN. Telefax 58-43-320729 San Juan de Los Morros. Guárico. Venezuela.

### Abstract

#### ELISA vs RIA Techniques Comparison in the Plasmatic Progesterone Determination in Bovines

Plasma progesterone (P<sub>4</sub>) concentrations using ELISA kit and RIA kit were examined in 56 samples of bovine heifers. The intra - and inter-assay coefficients of variation were 5.77 %, 6.50 % and 5.85, 8.50 % respectively, based on two plasma samples. There was a significant correlation between ELISA and RIA results based on 56 plasma samples ( r = 0.933; P < .05). Simple linear regression, two samples t test and one way analysis of variance indicated that there were not significant differences between ELISA and RIA. Serum P<sub>4</sub> concentrations examined in non-pregnant heifers were normal changes of P<sub>4</sub> levels observed during all the estrous cycles. Comparison of The ELISA system with the RIA system gave a regression linear ELISA = 2.7001 + 1.2431 X ( r<sup>2</sup> = 0.89). Total time needed for the ELISA assay was approximately 1 ½ h. It was concluded that ELISA kit was available for measuring P<sub>4</sub> concentrations in bovine heifers. In general, ELISA also offers the advantages of less expensive detector instrumentation, longer shelf-life of reagents and more simplified assay protocols, which can potentially lead to greater automation, than RIA.

**Palabras claves:** ELISA, RIA, progesterona.

**Key words:** ELISA, RIA, progesterone.

### Introducción

La medición de progesterona plasmática (P<sub>4</sub>) tiene una aplicación practica como método para mejorar la eficiencia reproductiva en la producción animal. Por ejemplo, la P<sub>4</sub> sirve para el diagnóstico de preñez en diferentes especies, confirmar el celo en vacas, novillas y búfalas, así como monitorear la fertilidad en el ganado (Roa, 1996). El método más usado ha sido el radioinmunoensayo (RIA). Sin embargo, el RIA tiene varias limitaciones sobre todo las relacionadas al uso de isótopos radioactivos (Van de Wiel, 1986). De allí que actualmente se intenta sustituir el uso de radioisótopos con otros reactivos como son las enzimas (Morrel, 1993). Asimismo, el principal problema del enzimoimmunoanálisis (ELISA) posiblemente sea la interferencia de otras hormonas durante el ensayo cuando se desea determinar una hormona específica, es el llamado "efecto matrix" (Van de Wiel, 1986). Este efecto puede ser disminuido purificando la hormona de la muestra o aumentando la sensibilidad reduciendo el volumen de la muestra disminuyendo así este efecto. Con la finalidad de evaluar el uso de los dos sistemas en nuestro medio, se diseñó un ensayo donde se procesaron muestras pareadas para ambas técnicas.

### Materiales y métodos

**Muestreo sanguíneo.** El estudio incluyó un total de 56 muestras de plasma sanguíneo de novillas mestizas *Bos indicus* x *Bos taurus*. Se colectaron 8 mL de sangre de los vasos coccígeos el día del celo (día 0), el día 7, 21, 28, 35, 42 y 49 post celo en tubos vacutainer con EDTA potásica. Inmediatamente se centrifugaron para evitar su metabolización (Vahdat *et al.*, 1979; Pulido *et al.*, 1991) por 15 minutos a 3000 rpm, trasegándose el plasma obtenido a viales plásticos identificados para su congelación a -20 °C, hasta su procesamiento en el laboratorio por la técnica de RIA (Díaz, 1991) y por la técnica de ELISA (Munro & Stabenfeldt, 1984). Se uniformizaron todos los factores que pudieron influir en el muestreo, haciéndolo a una misma hora en la mañana (6:30 am) los días del muestreo, manteniendo el mismo patrón de recolección, centrifugación, congelación y almacenamiento.

**Técnica de enzimoimmunoanálisis (ELISA).** La cuantificación hormonal se realizó utilizando kits de ELISA (Munro & Stabenfeldt, 1984, Kubiak, 1986). Se usó un lector de placas de ELISA Multiskan Plus 1.4, ajustando el espectrofotómetro para leer absorbancia a 405 nm. Como control de calidad de los Kits se realizaron las pruebas de validación, para especificidad la prueba de paralelismo y para precisión, el cálculo del coeficiente

de variación (CV) intra e interensayo (Silvan *et al.*, 1992; Manzo, 1987). La evaluación realizada al Kit utilizado señaló que tiene paralelismo. El CV intraensayo calculado fue de 5.77 % y el CV interensayo fue de 6.50 % valores que están dentro de los rangos óptimos de CV para ambas pruebas .

**Técnica de radioinmunoensayo (RIA).** El método de RIA usado fue el descrito por Manzo (1987). El ensayo y el antisuero usado fue producido en ovejas contra  $\text{Ñ}^4$  pregnen-3.20 dione-6 BSA, validado y elaborado por la AIEA y por Manzo (1987).

**Análisis estadístico.** Los datos fueron analizados por correlación para determinar el grado de asociación existente entre las diferentes concentraciones de  $P_4$  en los diferentes días de muestreo. El análisis de regresión lineal para verificar el grado de predicción de las concentraciones de  $P_4$  de cada día del ciclo estral en los diferentes días del muestreo. La prueba de t pareado para verificar significancia entre las 2 técnicas. El análisis de varianza para determinar si existía diferencias significativas de concentraciones  $P_4$  entre las dos técnicas para los diferentes días del muestreo y la prueba de comparación de medias de Tukey. Los análisis estadísticos fueron realizados siguiendo los procedimientos descritos por Steel y Torrie (1988).

## Resultados y discusión

La confiabilidad de los ensayos usando ambos sistemas fue el siguiente: Sensibilidad del ensayo, para el caso del RIA fue de 0.175 ng/mL, para el caso del ELISA fue de 0.03 ng/mL. Precisión del ensayo, basado en dos muestras de plasma para cada sistema (RIA y ELISA), se obtuvieron un coeficiente de variación intra e interensayo de 5.77 %, 6.50 % respectivamente para ELISA y 5.85 %, 8.580 % para RIA.

Los resultados de correlación de ELISA con respecto al RIA fueron significativos ( $r = 0.933$ ,  $P < .05$ ) obteniéndose la siguiente ecuación de regresión lineal  $\text{ELISA} = 2.7001 + 1.2431 \text{ RIA}$ .

En general, se observaron los cambios típicos de las concentraciones de  $P_4$  de acuerdo al estado fisiológico del ciclo estral de la hembra el día del muestreo tanto para el sistema RIA como el ELISA. Estos resultados nos indicaron una alta similitud entre ambas técnicas, donde si se considera el protocolo de ambos sistemas podemos decir que el ELISA combina las ventajas de la técnica de inmunofluorescencia y del radioinmunoensayo por el uso de antígenos y anticuerpos y elimina muchas de las desventajas de ambos métodos. Los reactivos enzimáticos marcados son menos costosos de preparar y son altamente estables, lo que proporciona un mayor tiempo de depósito. Los equipos necesarios para el ELISA son menos costosos y los resultados son obtenidos con relativa rapidez. El ELISA en este ensayo, tiene una sensibilidad muy cercana a la del RIA y sus resultados pueden ser determinados visualmente o también con un equipo simple a diferencia del RIA que utiliza radioisótopos.

Todos los principios básicos empleados en el procedimiento de ELISA son los mismos usados para el RIA cuantitativo, con la diferencia de que la medición de la actividad de la enzima en ELISA es por fotocolorimetría, mientras que en RIA es por conteo de radioactividad.

Asimismo, como el ELISA tiene en el mercado kits comerciales, sus costos son más bajos en comparación al RIA, ya que posee los requerimientos necesarios (alta precisión, repetibilidad y sensibilidad) para ser una buena herramienta para medir esteroides en comparación con los métodos empleados tradicionalmente, ya que presenta una alta correlación con el RIA ( $r = 0.933$ ).

## Conclusiones y recomendaciones

se recomienda el uso de la técnica de ELISA como otro sistema de determinación hormonal en ya que es un método rápido y simple que sirve como herramienta para diagnóstico y tratamiento problemas reproductivos en bovinos a nivel de finca.

## Literatura citada

- Roa, N. 1996. Relación entre Concentraciones de Progesterona y la Tasa de Preñez en Receptoras de Embriones Bovinos. Tesis de Postgrado Magister Scientiarum. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezue-la.1-106.
- Van De Wiel, D. F. M. y Koops, W. 1986. Development and validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma. *Animal Reproduction Science*. 10: 201 - 213.
- Morrell, J. M. 1993. Preliminary investigation of an ELISA kits a qualitative assay for rabbit progesterone. *Vet. Rec.* 132: 434-436.
- Vahdat, F.; Hurtgen, J. P.; Whitmore, H. L., Johnston, S. D. y Ketelsen, C. L. 1979. Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. *Theriogenology* 12: 371-374.

- Pulido, A.; Zarco, L., Galina, C. S., Murcia, C., Flores, G. y Posadas, E. 1991. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 35:965-975.
- Diaz, T. 1991. Desarrollo del radioinmunoanálisis para la determinación de progesterona en plasma de yegua, cerda y oveja. Trabajo de ascenso a Profesor Asistente. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Venezuela. 1-63.
- Munro, C. & G. Stabenfeldt. 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for determination of progesterone. *J. Endocr.* 101: 41 - 49.
- Kubiak, J. 1986. Application of enzyme immunoassay (EIA) to the study of hormones, with particular reference to the determination of progesterone. Research Technique Report In partial fulfillment of the requirements for: ANSC 631. Physiology of Reproduction. 1-6.
- Silvan, G.; Illera, J. C.; Illera, M. J.; Illera, M. 1992. Development and validation of competitive ELISA to measure steroid follicular fluid levels in heifers. *Theriogenology*. 37 (1): 298.
- Manzo, M. 1987. Avances en la aplicación de la técnica de Radioinmunoanálisis en la Producción Animal. XXXVII Convención Anual ASOVAC. Noviembre.
- Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. McGraw Hill. Ed. 2ª Edición. México. 1-622.