

Utilização das proteínas associadas à gestação (PAG's - Bovine Pregnancy Test Idexx®) como método de diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras da raça girolando

Use of proteins associated with pregnancy (PAG's - Bovine Pregnancy Test Idexx®) as a method of early diagnosis of pregnancy in girolando dairy cows

Uso de proteínas asociadas con el embarazo (PAG's - Bovine Pregnancy Test Idexx®) como método de diagnóstico precoz del embarazo en vacas lecheras gyrolando

Recebido: 09/02/2021 | Revisado: 12/02/2021 | Aceito: 14/02/2021 | Publicado: 21/02/2021

Edivânia Maria de Freitas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9381-3582>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: edvaniafreitasvet@gmail.com

Breno Barros de Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8121-5270>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: brenobarrossantana@hotmail.com

Carlos Rhuan Rocha Malta

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4339-0064>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: rhuanmalta@hotmail.com

José Augusto Tenório de Sousa Bernardo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6345-5406>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: joseaugustotcb@gmail.com

Emanuel Felipe Oliveira Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2836-5549>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: felipe130188@gmail.com

Gustavo Ferrer Carneiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9466-9500>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: carneirogustavo1@gmail.com

Resumo

Objetivou-se com este estudo observar a eficácia da utilização das Proteínas Associadas à Gestação (PAG's) como método de diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras da raça Girolando. Por meio de um teste de reação colorimétrica, recomendado para uso em vacas a partir do 28º dia pós-serviço, o VISUAL-PAG do "IDEXX Laboratories". Verificou-se a sensibilidade e especificidade do teste aos 25, 26, 27 e 28 dias pós-Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), utilizando-se 57 fêmeas multiparas, submetidas a quatro coletas sequenciais de amostras de sangue nos dias descritos. O material foi coletado através de venopunção dos vasos coccígenos em tubos de vácuo sem anticoagulante, processado e armazenado a -20°C para posterior análise. Aos 32 dias da IATF todas as fêmeas foram submetidas ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia (US), teste padrão do experimento. Os resultados foram obtidos através de um estudo de concordância, onde revelou sensibilidade de 100% e especificidade de 94,7% iguais para os dias 25, 26, 27 e 28 pós-IATF. Diante destes resultados pode-se considerar que o kit VISUAL-PAG pode ser utilizado como um método de diagnóstico precoce e seguro de gestação em vacas leiteiras da raça Girolando aos 25 dias pós-inseminação artificial.

Palavras-chave: Bovinocultura leiteira; Diagnóstico; Girolando; Pag's.

Abstract

The objective of this study was to observe the effectiveness of the use of proteins associated with pregnancy (PAG's) as a method of early pregnancy diagnosis in Girolando dairy cows. By using a colorimetric reaction test, recommended for use in cows from the 28th day after service, VISUAL-PAG from "IDEXX Laboratories". The sensitivity and specificity of the test were assessed at 25, 26, 27 and 28 days post-TAI, using 57 multiparous females submitted to four sequential collections of blood samples on the days described. The material was collected by venipuncture of the coccidian vessels in vacuum tubes without anti-coagulant, processed and stored at -20°C for later

analysis. At 32 days of TAI all females were subjected to the diagnosis of pregnancy by ultrasonography (US), the Gold Test of the experiment. The results were obtained through a concordance study, which revealed 100% sensitivity and 94.7% specificity for days 25, 26, 27 and 28 post-TAI. In view of these results, it can be considered that the VISUAL-PAG kit can be used as an early and safe method of early pregnancy diagnosis in Girolando dairy cows at 25 days after artificial insemination.

Keywords: Dairy cattle; Diagnostics; Girolando; Pag's.

Resumen

El objetivo de este estudio fue observar la efectividad del uso de proteínas asociadas con la gestación (PAG) como método de diagnóstico precoz del preñez en vacas lecheras Girolando. A través de una prueba de reacción colorimétrica, recomendada para su uso en vacas a partir del 28° día posterior al servicio, el VISUAL-PAG de "IDEXX Laboratories". La sensibilidad y especificidad de la prueba se verificaron a los 25, 26, 27 y 28 días después de la Inseminación Artificial de Tiempo Fijo (IATF), utilizando 57 hembras múltiparas, enviadas a cuatro colecciones secuenciales de muestras de sangre en los días descritos. El material se recolectó mediante venopunción de los vasos coccígeos en tubos de vacío sin anticoagulante, se procesó y almacenó a -20°C para su posterior análisis. A los 32 días después de IATF, todas las hembras fueron sometidas a un diagnóstico de embarazo por ultrasonido (US), la prueba estándar del experimento. Los resultados se obtuvieron a través de un estudio de acuerdo, donde reveló un 100% de sensibilidad y un 94,7% de especificidad para los días 25, 26, 27 y 28 posteriores a la IATF. En vista de estos resultados, se puede considerar que el kit VISUAL-PAG puede usarse como un método de diagnóstico precoz y seguro del preñez en vacas lecheras Girolando a los 25 días después de la inseminación artificial.

Palabras-clave: Bovinocultura lechera; Diagnóstico; Girolando; Pag's.

1. Introdução

A cada ano a atividade leiteira tem se tornado mais especializada e exigente (Moraes, 2013). A produção mundial de leite se concentra em países com maior índice de desenvolvimento tecnológico e financeiro, o que insere o Brasil como 6° maior produtor, com cerca de 23 bilhões de litros, correspondendo a 5% da produção mundial. Nos estados do Nordeste a produção entorna 3,8 bilhões, com acréscimo do volume de 290 milhões, destacando Pernambuco como o estado que mais contribuiu para este incremento com 95 milhões de litros de leite produzidos (IBGE, 2015; USDA, 2019). Os maiores produtores de leite são considerados a União Europeia, Estados Unidos e a Índia, estes países juntos participam com cerca de 65,0% toda produção mundial (USDA, 2019).

A eficiência reprodutiva de um rebanho é um dos componentes mais importantes no desempenho econômico de uma propriedade de produção de leite (Leite, 2001). Utilizando os índices reprodutivos e produtivos como indicadores de desempenho é possível antecipar, calcular, organizar e melhorar os eventos ligados à reprodução (Torres Junior et al., 2009). Por sua vez, a não observação destes indicadores elevaria o número de vacas improdutivas dentro do rebanho, bem como as despesas para manutenção destas, comprometendo economicamente a atividade (Barbosa et al., 2011).

O diagnóstico de gestação na bovinocultura de leite constitui-se numa ferramenta estratégica no manejo geral de uma propriedade, onde o conhecimento da existência ou não de gestação possibilita a tomada de decisões, as quais podem afetar diretamente os índices de produtividade com reflexos econômicos imediatos (Neves et al., 2002). Associado ao uso de biotécnicas, o diagnóstico precoce da gestação torna-se uma valiosa técnica para o incremento da eficiência reprodutiva, pois possibilita tanto a adoção de um manejo adequado das fêmeas prenhes, quanto à ressinchronização e reinseminação de fêmeas não gestantes o mais cedo possível (Gradela et al., 2009; Green et al., 2011). Identificar métodos de baixo custo, eficazes e precisos para determinar o estado de preñez de uma vaca é uma prioridade no intuito de diminuir os intervalos de cruzamento e aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos, consequentemente aumentando a dos laticínios (USDA, 2007).

As glicoproteínas associadas à preñez (Pregnancy-Associated Glycoprotein – PAG's) tem sido descrita como um bom marcador da gestação e da viabilidade fetal, com concentrações em ascendência no sangue materno a partir do 22° dia até a última semana de gestação (Abdulkareem et al., 2012).

Testes comerciais vêm sendo utilizados em pesquisas para detecção de PAG em mamíferos como o VISUAL-PAG (IDEXX VISUAL pregnancy test) que permite uma leitura dos resultados através da coloração das amostras de soro sanguíneo

na própria placa de microtitulação, podendo ser aplicado em condições de campo, ou por meio do ELISA-PAG (IDEXX ELISA Pregnancy test), devendo este ser realizado no aparato laboratorial (Chaves, 2016).

A detecção precoce de prenhez em vacas de leite é um componente essencial em atuais programas de gestão reprodutiva, possibilitando encurtar o intervalo entre partos e maximizar a produção leiteira (Commun et al., 2016). Estudos anteriores demonstraram que o diagnóstico de gestação a partir de 25 dias pós-inseminação, com base nas concentrações de PAG, resultaram numa precisão aceitável (Silva et al., 2007; Green et al., 2009). Todavia, sua expressão pode ser influenciada pelas diferenças entre raças de bovinos, que apresentam variações nas concentrações de PAG circulantes no soro materno no decorrer da gestação (Mercadante et al., 2013).

Dentro desse contexto, objetivou-se com este estudo testar a eficácia e determinar a sensibilidade e especificidade do kit comercial VISUAL-PAG (IDEXX pregnancy test) em bovinos leiteiros da raça Girolando aos 25 dias pós-IATF.

2. Material e Métodos

O experimento realizado seguiu as recomendações da legislação brasileira, sobre procedimentos de uso científico de animais (Lei nº 11.794 / 2008), com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade Pio Décimo sob a licença nº 10/2016. O estudo foi conduzido numa propriedade de bovinos Girolando leiteiro $\frac{3}{4}$ de sangue. Situada na Microrregião do Vale do Ipojuca (08° 23' 56" latitude sul e 35° 03' 50" longitude oeste), dentro da Mesorregião do Agreste Pernambucano em parceria com o Laboratório de Reprodução Animal da Unidade Acadêmica de Garanhuns da UFRPE (LABRAPE/UAG) e a Clínica de Bovinos de Garanhuns (CBG).

Foram selecionadas 57 fêmeas criadas em sistema de confinamento intensivo com cobertura de sombrites. Água e sal mineral *ad libitum*. E ração total processada à base de silagem de milho, cana-de-açúcar, palma forrageira, cevada, farelo de soja, milho triturado e caroço de algodão. Sendo a mistura fornecida três vezes ao dia diretamente no cocho e em quantidades correspondentes às exigências de produção dos animais. O experimento foi conduzido com metodologia quantitativa a respeito do objetivo geral, através da metodologia descrita por Pereira et al. (2018).

Todas as vacas selecionadas para compor o experimento eram múltíparas e estavam em lactação, sendo ordenhadas três vezes ao dia com intervalos de oito horas entre ordenhas. Previamente foram submetidas à avaliação clínica-ginecológica e selecionadas àquelas que estavam aptas a serem inseminadas e com mais de sessenta dias pós-parto (Figura 1).

Figura 1: Animais selecionados para o experimento.



Fonte: Autores.

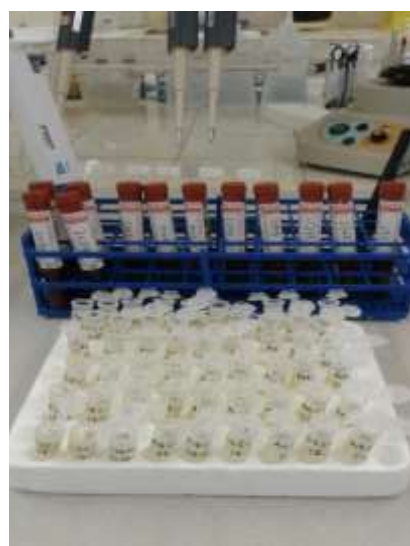
A Figura 1 ilustra o local de experimento bem como os animais avaliados. A realização IATF procedeu-se a cargo do veterinário técnico da propriedade, realizada em quatro etapas compreendendo os meses de maio a julho de 2016. O protocolo de sincronização de cio instituído correspondia à administração intramuscular (i.m) de 2mg de benzoato de estradiol (BE) e colocação de dispositivo intravaginal impregnado com progesterona (P4) na concentração de 750mg no D0 (início do protocolo); no D8 retirava-se o dispositivo de P4 e aplicava-se 150mcg de cloprostenol sódico (PGF2 α) por via i.m; no D9 administrava-se mais 1mg de BE i.m com a IATF realizada no D10 (48 horas após retirada da P4).

Foram realizadas coletas sequenciais de sangue de 57 animais nos dias 25, 26, 27 e 28 pós-inseminação, por meio de venopunção dos vasos coccígeos com agulhas e tubos de vácuo sem anticoagulante mediante prévia assepsia local com álcool a 70% (Figura 2). O que gerou um total de 228 amostras. Anotou-se a numeração dos animais, bem como a numeração dos tubos, e após retração do coágulo seguiu-se o processo de centrifugação por 10 minutos a 900g. O soro obtido foi extraído por aspiração, transferidos para microtubos de polipropileno (eppendorf), identificados e armazenados a - 20°C (Figura 3) para posterior análise na Central de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG), Unidade Acadêmica de Garanhuns, da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Figura 2: coleta de sangue dos vasos coccígenos.



Figura 3: identificação das amostras.



Fonte: Autores.

Figuras 2 e 3, apresentam a realização de coleta de sangue dos vasos coccígenos e identificação das amostras e disposição em bandeja de isopor, respectivamente. O diagnóstico precoce de prenhez através das PAG's foi realizado por meio do *bovine pregnancy test idexx®* - kit VISUAL (Figura 4). Recomendado pelo fabricante para uso em vacas a partir do 28º dia pós-serviço. O qual consiste num ensaio em placa de microtitulação, contendo controle negativo e positivo (Figura 4a e 4b). As amostras testadas (soro) e a solução detectora específica do anticorpo para PAG (Figura 4c) foram co-incubadas em poços revestidos com o anticorpo PAG. O anticorpo não ligado foi removido por lavagem com água destilada e um conjugado de peroxidase de raiz forte (Figura 4d) adicionado aos poços. O conjugado não ligado também passou pelo processo de lavagem e o substrato de tetrametilbenzina (TMB) foi adicionado aos poços (Figura 4e). Sendo utilizada, ao final dos processos, a adição da solução interruptora (Figura 4f)

Figura 4: composição do kit VISUAL: controle negativo (a); controle positivo (b); solução detectora de PAG (c); Peroxidase de raiz forte (d); substrato TMB (e); solução interruptora (f).



Fonte: Autores

A Figura 4 demonstra a composição do kit VISUAL, detalhando suas soluções. As amostras foram distribuídas na placa de microtitulação em sentido vertical da esquerda para direita sempre no direcionamento norte-sul. Sendo os dois primeiros poços preenchidos com o controle negativo e positivo. Seguindo, então, a disposição das amostras nos poços subsequentes por animal em identificação numérica crescente de 1 a 57 e na sequência dos dias coletados: 1, 2, 3 e 4 a partir do 25º dia pós-IATF (Tabela 1).

Tabela 1: Ilustração da disposição das amostras na placa de microtitulação. Onde A (Animal) e C (Coletas).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C -	A2 C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	C+	A2 C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	A1 C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	A1 C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	A1 C3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A57 C1
F	A1 C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A57 C2
G	A2 C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A57 C3
H	A2 C2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A57 C4

Fonte: Autores

A Tabela 1 representa a disposição das amostras na placa de microtitulação, constando as amostras e coletas realizadas. A leitura da placa após o processamento das amostras era realizada na observação da mudança de coloração do poço para a cor azul, determinando que o animal encontrava-se com prenhez positiva, já ausência da coloração definia os animais como não prenhes.

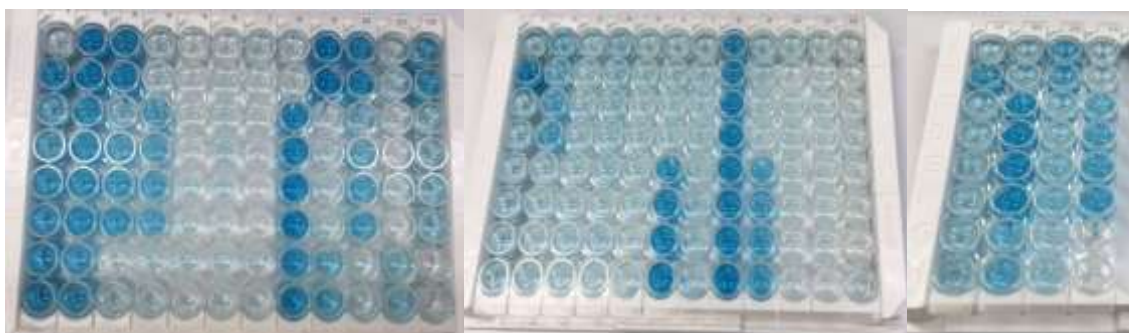
O teste padrão do experimento utilizado para comparar os resultados do ensaio foi realizado no 32º dia pós-IATF por meio de Ultrassonografia (US) realizada por profissional capacitado com aparelho Mindray modelo Dp 2200 vet, e probe ajustada para frequência de 5MHz. A fim de identificar os animais prenhes e não prenhes. Tendo como parâmetro para o diagnóstico positivo de gestação a visualização do conceito com presença de batimento cardíaco.

Para o estudo de concordância entre os testes utilizou-se o coeficiente de Kappa (K) e a interpretação convencional dos valores K adotadas foram: 0,00 - 0,20 = concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa; 0,81- 1,00 = muito boa, valores negativos são interpretados como equivalentes a 0,00 (Landis & Koch, 1977). Para o cálculo de concordância utilizou-se o programa computacional Bioestat versão 5.0.

3. Resultados

Os resultados obtidos através das amostras testadas nos poços do kit-VISUAL que apresentaram coloração azul foram interpretados como prenhez positiva, já os poços com ausência de coloração foram interpretados como prenhez negativa (Figura 5).

Figura 5: Resultados obtidos das amostras na placa de microtitulação do Kit-VISUAL.



Fonte: Autores.

A Figura 5 apresenta os resultados obtidos das amostras na placa de microtitulação com os seus devidos poços preenchidos. Dos 57 animais testados para os dias 25, 26, 27 e 28 pós IATF, com base nesse método de diagnóstico, 21 apresentaram prenhez positiva e 36 animais foram considerados não prenhes para os dias testados. Já os resultados obtidos através do diagnóstico por US no 32º dia pós IATF: apenas dois dos 21 animais diagnosticados como prenhe através do Kit-VISUAL, foram negativo ao exame ultrassonográfico. E todos os animais diagnosticados como não prenhes através do Kit-VISUAL, foram também assim confirmados no diagnóstico por US. A sensibilidade e especificidade do teste para os dias 25, 26, 27 e 28 pós IATF foram similares e corresponderam a 100% e 94,7% respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Ilustração da disposição das amostras e seus resultados no dia PAG/25, USG/D32 positivo ou negativo, sensibilidade, especificidade, valor p e Kappa.

DIA	USG/D32		SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE	Valor de p	Kappa
	Positivo	Negativo				
PAG/D25						
Positivo	19	2	100%	94,7%	<0,001	0,923
Negativo	0	36				
PAG/ D26						
Positivo	19	2	100%	94,7%	<0,001	0,923
Negativo	0	36				
PAG/ D27						
Positivo	19	2	100%	94,7%	<0,001	0,923
Negativo	0	36				
PAG/D28						
Positivo	19	2	100%	94,7%	<0,001	0,923
Negativo	0	36				

Fonte: Autores.

A Tabela 2 apresenta a disposição das amostras e seus resultados no dia PAG/25, USG/D32 positivo ou negativo, sensibilidade, especificidade, valor p e Kappa.

4. Discussão

Associado a fatores nutricionais e de ambiência, o manejo reprodutivo bem elaborado dentro de uma propriedade produtora de leite permite uma maior constância na produção leiteira durante todo o ano. Desafio este comum em fazendas que buscam produções eficientes. Barbosa et al. (2011) comentam que, do contrário, um cenário reprodutivo ineficiente reduz a taxa de prenhez e aumenta o intervalo entre partos, o que diminui, conseqüentemente, a produção de bezerras e aumenta os custos de manutenção das vacas secas.

O diagnóstico gestacional, quando realizado o mais precoce possível, possibilita a tomada de decisão no manejo das fêmeas que não emprenharam. De modo a encurtar o período de serviço e otimizar a produção leiteira. Romano et al. (2007) e Silva et al. (2009) destacam as técnicas de palpação retal e ultrassonografia como as mais utilizadas para diagnóstico precoce de gestação. Todavia, Pohler et al. (2016) inferem que elas são limitadas no que diz respeito a quantidade de técnicos habilitados para esse diagnóstico. Neves et al. (2008) relatam que exames ecográficos realizados antes do 25º dia estão 50% mais susceptíveis a erros em relação aos feitos a partir dessa data. Descôteaux et al (2009) acrescentam que a ultrassonografia se torna rápida e segura quando realizada a partir do 27º dia pós IA.

A detecção de prenhez através de métodos químicos tem se tornado uma prática cada vez mais comum (Pohler et al., 2016). No que diz respeito a estes métodos, as PAG's, por sua vez, têm sido descritas na literatura como um bom marcador da gestação e da viabilidade fetal com ascendência no sangue materno a partir do 22º dia de gestação (Abdulkareem et al., 2012). Segundo Motta et al. (2018), ao avaliarem o uso de biomarcadores séricos no diagnóstico de gestação em vacas, consideraram os resultados como um importante método na identificação reprodutiva, fornecendo informações como o atraso reprodutivo, permitindo a ressincronização de estros de forma rápida e direcionada.

O Kit-VISUAL da Idexx é um método químico de diagnóstico de gestação precoce, rápido e de fácil aplicação em condições de campo. Sendo baseado em técnicas de laboratório para detecção de prenhez a partir do 28º dia pós-serviço. Nesse estudo, as análises realizadas através desse kit demonstraram 100% de sensibilidade e 94,7% de especificidade, iguais para os dias 25, 26, 27 e 28 pós-IATF das fêmeas leiteiras da raça girolando, frente aos resultados obtidos no exame ultrassonográfico

no D32. Dados estes, semelhantes aos observados no experimento de Bragança et al. (2012) com vacas zebuínas quando se avaliou a acurácia do kit-Visual no 25º e 28º dia pós-IATF, com sensibilidade de 100% e especificidade de 92,86%. Já no experimento de Karen et al. (2015), ao analisarem a sensibilidade e especificidade do teste ELISA (VISUAL-PAG), em 100 vacas da raça holandesa ao 28º dia pós-IATF, os resultados foram divergentes em relação ao presente estudo, com sensibilidade de 90,2% e especificidade de 98,3%. Possivelmente este resultado está relacionado as diferenças entre raças e fins produtivos (produção de leite), o que para Mercadante et al. (2013) pode influenciar ou fazer com que ocorram variações de expressão das PAG's no soro sanguíneo. Roberts et al. (2015) e Thompson et al. (2012), relatam que os animais *Bos indicus* apresentaram maior concentrações de PAG no soro no início da gestação quando comparados aos animais *Bos taurus* com a genética Angus.

López-Gatius et al. (2007) relataram pela primeira vez uma associação negativa entre os níveis plasmáticos de PAG e a produção de leite. Atribuindo esta relação a uma diminuição destes níveis à medida que a produção aumenta, não a um resultado da diluição dos níveis de PAG no leite com o aumento da produção. Clemente et al. (2009) explicaram que este fato pode ocorrer devido a vacas com maior produção de leite apresentarem concentrações mais baixas de progesterona logo após a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), principalmente atribuído ao aumento do metabolismo hepático da progesterona, o que inibe o crescimento do embrião e leva a uma diminuição da produção de PAG.

Ricci et al. (2015), ao avaliar as concentrações de PAGs no plasma e leite de vacas Holstein primíparas e múltiparas encontraram níveis plasmáticos aproximadamente 2 vezes maiores em comparação com os níveis no leite, além disso as vacas primíparas apresentaram maiores níveis de PAG no plasma e no leite em comparação com vacas múltiparas. Ao avaliar a utilização do teste de prenhez rápido bovino em ovinos, Chaves et al. (2019) constataram que o teste identificou corretamente 100% das amostras e prenhez nos dias 26, 28 e 30, além de obter uma sensibilidade e especificidade de 100%. Ainda segundo os autores, o teste inicialmente utilizado para bovinos é eficaz na detecção de prenhez na espécie ovina, possibilitando o diagnóstico de ovinos prenhes a partir do 26º dia de prenhez.

Neste experimento, os animais utilizados foram oriundos do cruzamento entre *Bos taurus* (holandês) e *Bos indicus* (Gir), observando-se elevada sensibilidade para detecção das PAG's no soro sanguíneo. Até o presente momento, não há estudo relatando nesta raça a sensibilidade e especificidade encontrada em nosso trabalho, sendo este considerado como um marco inicial sobre o diagnóstico precoce em relação aos dados do fabricante. Entretanto, a elevada especificidade também verificada no estudo se assemelha aos resultados obtidos por Bragança et al. (2012) em fêmeas zebuínas; Green et al. (2009) em bovinos leiteiros e Karen et al. (2007) em búfalas. Reese et al. (2017) ao avaliar as PAGs em vacas e novilhas Holstein x Gir, observaram que as concentrações circulantes de PAG no dia 24 de gestação são maiores em animais prenhes do que não prenhes. Segundo ainda os autores, dependendo do método de acasalamento, as PAGs podem sofrer uma variação muito grande em decorrência de irregularidades ou falhas no desenvolvimento embrionário.

Apenas dois animais diagnosticados como prenhe no período de 25 a 28 pós-IATF mediante pesquisa das PAG's, tiveram resultados diferentes ao observado no D32 através do exame de ultrassom. Culminando num resultado falso-positivo. Todavia, este resultado falso-positivo também foi verificado no estudo de Bragança et al. (2012), sendo atribuído às perdas embrionárias. É possível que os dois animais tiveram perda embrionária, mas ainda apresentavam PAG's circulantes possíveis de serem detectadas pelo teste nas coletas do dia 25 a 28. E no momento da realização do teste padrão do experimento no D32, as fêmeas apresentaram-se vazias.

A mortalidade embrionária neste período de gestação coincide com os resultados apresentados por Barros e Visintin (2001), onde relataram maior perda embrionária no período de 25-45 dias de gestação. Semelhante a estes resultados, Vasconcelos et al. (1997), descreveram que a mortalidade embrionária tardia ocorre com maior frequência entre 28-42 dias de gestação. Ambos os experimentos justificam os resultados falso-positivo obtidos nesse estudo.

O diagnóstico precoce da gestação é uma ferramenta importantíssima para a otimização da produção, informando ao médico veterinário, trabalhadores/as e produtores/as o estado gestacional das fêmeas a fim de acompanhamento do desenvolvimento gestacional, bem como evitar perdas econômicas nos sistemas de criação animal. Possibilitando um melhor rendimento das fêmeas e a aplicação de estratégias para a maximização da produtividade e da lucratividade. Com as informações precoces sobre o estado gestacional da fêmea, visa-se programar e diferenciar o rebanho, além de fornecer informações sobre possíveis erros/problemas de fertilidade e defeitos congênitos, adequar o manejo e alimentação necessária aos animais.

A detecção precisa da prenhez em vacas é um componente essencial para os programas de manejo reprodutivo bovino. O bom desempenho reprodutivo tem múltiplos benefícios financeiros, além dos lucros aumentados resultando em maior produção de leite adicional, menos abate de vacas boas devido a falha reprodutiva, mais bezerros por ano como substitutos, melhoramento do avanço genético, manejo mais confiável e menos variação na duração da lactação e período de seca.

5. Conclusão

Apesar do fabricante do kit-VISUAL recomendar seu uso em bovinos a partir do 28º dia pós-serviço, não houve diferença estatística nesse estudo quando se antecipa o teste para o 25º dia pós-IATF em fêmeas leiteiras da raça girolando. Podendo o mesmo ser utilizado com segurança como método de diagnóstico de gestação prático e precoce em fêmeas bovinas desta raça.

Referências

- Barbosa, C. F., Jacomini, J. O., Diniz, E. G., Santos, R. M. & Tavares, M. (2011). Inseminação artificial em tempo fixo e diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras mestiças. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(1), 79-84.
- Barros, B. J. P. & Visintin, J. A. (2001). Controle ultrassonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 38(2), 74- 79.
- Bragança, G. M. (2012). Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas pela detecção de glicoproteínas associadas à prenhez. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 67 f.
- Bragança, G. M., Viana, R. B., Campello, C. C., Zimmerman, S. O., Oliveira, W. M., Campos, D. S. & Medeiros, R. L. F. (2012). Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas pela detecção de glicoproteínas associadas à prenhez. 37 66f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2012.
- Chaves, C. M. S. (2016). Teste imunoenzimático visual para detecção de glicoproteínas associadas à prenhez em ovelhas. Dissertação (Mestrado em produção animal sustentável) – Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, 66p.
- Descôteaux, L., Gnemmi, G. & Colloton, C. (2009). Ultrasonography of bovine female genital tract. *Veterinary Clinics Food Animal*, 25, 733-752.
- Gradela, A., Daniel, T., Carneiro, T. & Valin, D. (2009). Exatidão da ultrassonografia para diagnóstico de gestação aos 28 dias após inseminação e sua contribuição na eficiência Diagnóstico precoce de gestação em vacas zebuínas utilizando a detecção de glicoproteínas associadas à prenhez reprodutiva em fêmeas Nelore e cruzadas. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 104, 31-35.
- Chaves, C. M. S., Costa, R. L. D., Duarte, K. M. R., Beltrame, R. T. & Quirino, C. R. (2020). Evaluation of a cattle rapid test for early pregnancy diagnosis in sheep. *Tropical Animal Health and Production*. 52, 1345–1349.
- Green, J. A., Newsom, E. M. & Lucy, M. C. (2011). Incorporation of a rapid pregnancy-associated glycoprotein ELISA into a CIDR-Ovsynch resynchronization program for a 28 day re-insemination interval. *Theriogenology*, 75, 320-328.
- Karen, A., Darwish, S., Ramoun, A., Tawfeek, K., Van Hanh, N., Sousa, N. M., Sulon, J., Szenci, O. & Beckers, J. F (2007). Accuracy of ultrasonography and pregnancy-associated glycoprotein test for pregnancy diagnosis in buffaloes. *Theriogenology*, 68, 1150–1155.
- Mercadante, P. M., Waters, K. M., Mercadante, V. R., Lamb, G. C., Elzo, M. A., Johnson, S. E., Rae, D. O., Yelich, J. V. & Ealy, A. D. (2013). Subspecies differences in early fetal development and plasma pregnancy-associated glycoprotein concentrations in cattle. *J Anim Sci*, 91(8):3693-3701.
- Motta, R. G., Malaquias, A. A. F., Ferreira, J. A. & Martins, L. S. A. (2018). Uso de biomarcadores no diagnóstico precoce de gestação em vacas. *Acta Veterinaria Brasilica*, 12(1), 01-106.

- Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J. & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica*. UFSM. https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.
- Pohler, K. G., Pereira, M. H. C., Lopes, F. R., Lawrence, J. C., Keisler, D. H., Smith, M. F., Vasconcelos, J. L. M. & Green, J. A. (2016). Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. *J Dairy Sci*, 99:1584-1594.
- Reese, S. T., Pereira, M. C., Edwards, J. L., Vasconcelos, J. L. & Pohler, K. G. (2017). Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation. *Theriogenology*.
- Roberts, J. N., Byrem, T. M. & Grooms, D. L. (2015). Application of an ELISA Milk Pregnancy Test in Beef Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(4), 651-658.
- USDA. (2007) NAHMS Dairy 2007 Part IV: Reference of dairy cattle health and management practices in the united states. USDA: APHIS: VS C, Fort Collins, CO. 2009. 33-43.
- Ricci, A., Carvalho, P. D., Amundson, M. C., Fourdraine, R. H., Vincenti, L. & Fricke, P. M. (2015). Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2502–2514.
- Vasconcelos, J. L. M., Silcox, R. W., Lacerda, J. A., Pursley, J. R. & Wiltbank, M. C. (1997). Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biol. Reprod.* 56:140.