

Acurácia do uso da expressão de genes estimulados por *interferon-tau* comparado à ultrassonografia Doppler para diagnóstico precoce de gestação em novilhas e vacas leiteiras

Leonardo Marin Ferreira Pinto^{1*}

Guilherme Pugliesi²

Priscila Assis Ferraz²

¹Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA); ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP)

*leonardomfp@usp.br

Objetivos

O objetivo deste estudo foi comparar a acurácia do uso da expressão de um gene clássico estimulado por IFN-tau (*ISG15*) e um novo potencial marcador de gestação (*RSAD2*) em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com a ultrassonografia Doppler (US Doppler) colorido 21 dias após a IATF em vacas e novilhas leiteiras.

Métodos e Procedimentos

Um total de 144 vacas e 32 novilhas da raça Holandês, foram submetidas a um protocolo hormonal de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). No dia 21 (D21; D0 = IATF), foram colhidas amostras de sangue dos vasos coccígeos para isolamento de PBMCs e posterior extração do RNA. A abundância de mRNA dos genes alvo (*ISG15* e *RSAD2*) foi determinada por PCR quantitativo de transcrição como descrito por Melo et al. (2020). Além disso, também foi avaliada a perfusão sanguínea do corpo lúteo por US Doppler colorido. O diagnóstico de gestação confirmatório foi realizado no D32 após a IATF pela visualização de um embrião viável determinado pela presença de

batimentos cardíacos usando ultrassonografia transretal modo B. Sendo classificadas as fêmeas como gestantes e não gestantes. Os dados foram analisados por ANOVA usando o procedimento PROC MIXED (SAS). Para *ISG15* e *RSAD2* os pontos de corte foram estabelecidos por meio da análise da curva ROC usando o Software MedCalc® (version 19.1; Medcalc Software). Este software também foi usado para determinar a área sob a curva (AUC) de cada método. A acurácia dos métodos de diagnóstico de gestação por ISGs e US Doppler em comparação com a ultrassonografia modo B no D32 (*Gold Standard*) foi calculado pelo número de observações de falso negativo (FN), verdadeiro positivo (VP), verdadeiro negativo (VN), falso positivo (FP), valor preditivo negativo (NPV), valor preditivo positivo (PPV), especificidade e sensibilidade, conforme previamente descrito por Pugliesi et al. (2014).

Resultados

A análise da Curva Roc indicou que a abundância dos genes *ISG15* (AUC= 0,70; P<0,0001) e *RSAD2* (AUC=0,71; P<0,001), e da US Doppler (AUC= 0,69; P<0.0001) foram bons preditores precoce da gestação nas

PBMCs em vacas e novilhas leiteiras. Quando a análise de curva ROC foi realizada em cada categoria animal (novilha ou vaca), foi observado também que a abundância das ISGs e o US Doppler foram preditores significativos ($P<0,05$) para determinação do status gestacional em ambas categorias (Figura 1). Em relação ao desempenho dos parâmetros, quando comparados ao diagnóstico confirmatório de gestação no D32, o US Doppler apresentou acurácia de 65,6% para novilhas e 52,1% para vacas, a abundância do ISG15 apresentou acurácia de 75,0% para novilhas e 57,4% para vacas e para a abundância do RSAD2 teve uma acurácia de 74,2% para novilhas e 66,7% para vacas (Tabela 1).

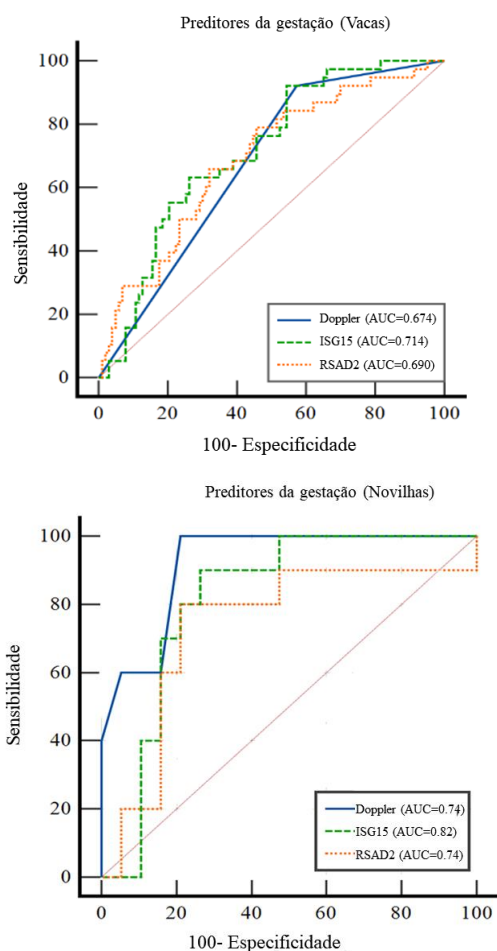


Figura 1. Curvas ROC para Doppler-US, ISG15 e RSAD2 no D21 após IATF para novilhas (A) e vacas leiteiras (B) quando comparados com o diagnóstico confirmatório no D32 após IATF.

Tabela 1. Resultados de Verdadeiro-Positivo (VP), Verdadeiro-Negativo (VN), Falso-Positivo (FP) e Falso-Negativo (FN) para determinação do status gestacional no D21 pós-IATF por US-Doppler, ISG15 e RSAD2 em vacas e novilhas leiteiras.

Endpoint	Heifers			Cows		
	Doppler-US	ISG15	RSAD2	Doppler - US	ISG15	RSAD2
N	32	29	31	144	141	144
TP (N)	11	9	9	35	35	26
TN (N)	10	13	14	40	46	70
FP (N)	11	6	6	66	57	35
FN (N)	0	1	2	3	3	13
SENS (%) ^a	100	90	81,8	92,1	92,1	66,7
SPEC (%) ^b	47,6	68,4	70,0	37,7	44,6	66,7
NPV (%) ^c	100	92,8	87,5	93	93,9	84,3
PPV (%) ^d	50	60,0	60	34,6	38	42,6
ACCU (%) ^e	65,6	75	74,1	52,1	57,4	66,7

Legenda: ^aSEN=Sensibilidade, ^bESP= Especificidade, ^c PPV=Valor preditivo positivo, ^dNPV=Valor preditivo negativo, ^eACU= Acurácia

Conclusions

De acordo com os resultados deste estudo, podemos concluir que a US-Doppler e expressão gênica das duas ISGs avaliadas são métodos significativos para diagnosticar a gestação aos 21 dias pós-IATF em vacas e novilhas leiteiras. No entanto, a acurácia de todos métodos em comparação ao método tradicional aos 32 dias pós-IATF foi inferior a 80% e apresentou abaixo valor preditivo positivo (<60%), o que pode estar associado a maior ocorrência de perda gestacional precoce ou luteólise tardia entre os dias 21 e 32 de gestação em fêmeas leiteiras.

Referências Bibliográficas

PUGLIESI, G. et al. Conceptus-Induced Changes in the Gene Expression of Blood Immune Cells and the Ultrasound-Accessed Luteal Function in Beef Cattle: How Early Can We Detect Pregnancy? *Biology of Reproduction*, 91 (4): 95, 1-2, 2014.

MELO, G. D. Applied use of interferon-tau stimulated genes expression in polymorphonuclear cells to detect pregnancy compared to other early predictors in beef cattle. *Theriogenology*, v. 152, p. 94-105, 2020.

SIQUEIRA, L. G. B. et al. Color Doppler flow imaging for the early detection of non-pregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *Journal Dairy Science*, 96: 6461-6472, 2013.

Accuracy of using interferon-tau stimulated gene expression compared to Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in dairy heifers and cows

Leonardo Marin Ferreira Pinto ^{1*}

Guilherme Pugliesi²

Priscila Assis Ferraz²

¹ Faculty of Animal Science and Food Engennering, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science- University of São Paulo

*leonardomfp@usp.br

Objectives

The objective of this study was to compare the accuracy of using the expression of a classical IFN-tau-stimulated gene (ISG15) and a new potential pregnancy marker (RSAD2) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with color Doppler ultrasound (US Doppler) 21 days after FTAI in dairy cows and heifers.

Materials and Methods

A total of 144 cows and 32 heifers of the Holstein breed, were submitted to a hormonal protocol of ovulation synchronization for fixed-time artificial insemination (FTAI). On day 21 (D21; D0 = FTAI), blood samples were collected from the coccygeal vessels for isolation of PBMCs and subsequent RNA extraction. The mRNA abundance of the target genes (ISG15 and RSAD2) was determined by quantitative transcription PCR as described by Melo et al. (2020). In addition, blood perfusion of the corpus luteum was also assessed by color Doppler US. Confirmatory pregnancy diagnosis was performed on D32 after FTAI by visualization of a viable embryo determined by the presence of heartbeats using B-mode transrectal ultrasonography. The females were classified as pregnant and non-pregnant. Data were analyzed by ANOVA using the PROC MIXED (SAS) procedure. For ISG15 and

RSAD2 cutoff points were established by ROC curve analysis using MedCalc® Software (version 19.1; Medcalc Software). This software was also used to determine the area under the curve (AUC) of each method. The accuracy of the pregnancy diagnosis methods by ISGs and Doppler US compared to B-mode ultrasonography on D32 (Gold Standard) was calculated by the number of observations of false negative (FN), true positive (VP), true negative (VN), false positive (FP), negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV), specificity and sensitivity, as previously described by Pugliesi et al. (2014).

Results

Roc Curve analysis indicated that abundance of ISG15 (AUC= 0.70; P<0.0001) and RSAD2 (AUC=0.71; P<0.001) genes, and Doppler US (AUC= 0.69; P<0.0001) were good early predictors of pregnancy in PBMCs in dairy cows and heifers. When the ROC curve analysis was performed in each animal category (heifer or cow), it was also observed that the abundance of GSIs and Doppler US were significant predictors (P<0.05) for determining the gestational status in both categories (Figure 1). Regarding the performance of the parameters, when compared to the confirmatory diagnosis of pregnancy on D32, the US Doppler showed accuracy of 65.6% for heifers and 52.1% for cows, the abundance of ISG15 showed

accuracy of 75.0% for heifers and 57.4% for cows and for the abundance of RSAD2 had an accuracy of 74.2% for heifers and 66.7% for cows (Table 1).

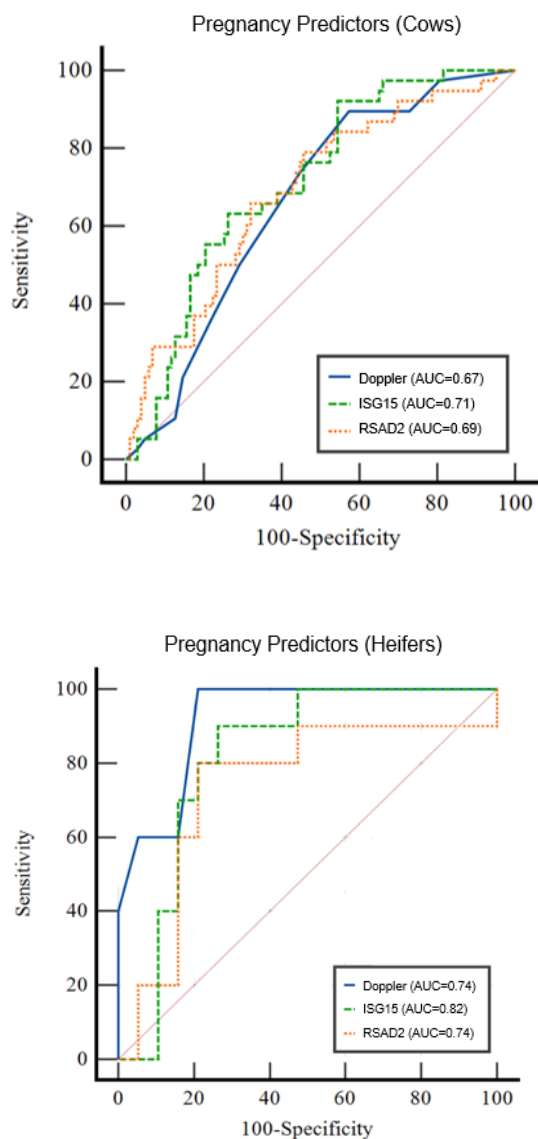


Figure 1. ROC curves for Doppler-US, ISG15 and RSAD2 at D21 after FTAI for heifers (A) and dairy cows (B) when compared to confirmatory diagnosis at D32 after FTAI.

Table 1. True-Positive (TP), True-Negative (TN), False-Positive (FP) and False-Negative (FN) results for gestational status determination on D21 post-FTAI by US-Doppler, ISG15 and RSAD2 in dairy cows and heifers.

Endpoint	Heifers			Cows		
	Doppler-US	ISG15	RSAD2	Doppler - US	ISG15	RSAD2
N	32	29	31	144	141	144
TP (N)	11	9	9	35	35	26
TN (N)	10	13	14	40	46	70
FP (N)	11	6	6	66	57	35
FN (N)	0	1	2	3	3	13
SENS (%) ^a	100	90	81,8	92,1	92,1	66,7
SPEC (%) ^b	47,6	68,4	70,0	37,7	44,6	66,7
NPV (%) ^c	100	92,8	87,5	93	93,9	84,3
PPV (%) ^d	50	60,0	60	34,6	38	42,6
ACCU (%) ^e	65,6	75	74,1	52,1	57,4	66,7

Legend: a SENS=Sensitivity, b SPEC=Specificity, c PPV=Positive Predictive Value, d NPV=Negative Predictive Value, e ACCU= Accuracy

Conclusions

According to the results of this study, we can conclude that US-Doppler and gene expression of the two ISGs evaluated are significant methods to diagnose pregnancy at 21 days post-FTAI in dairy cows and heifers. However, the accuracy of all methods compared to the traditional method at 32 days post-FTAI was less than 80% and presented low positive predictive value (<60%), which may be associated with higher occurrence of early gestational loss or late luteolysis between days 21 and 32 of gestation in dairy females.

References

- PUGLIESI, G. et al. Conceptus-Induced Changes in the Gene Expression of Blood Immune Cells and the Ultrasound-Accessed Luteal Function in Beef Cattle: How Early Can We Detect Pregnancy? *Biology of Reproduction*, 91 (4): 95, 1-2, 2014.
- MELO, G. D. Applied use of interferon-tau stimulated genes expression in polymorphonuclear cells to detect pregnancy compared to other early predictors in beef cattle. *Theriogenology*, v. 152, p. 94-105, 2020.
- SIQUEIRA, L. G. B. et al. Color Doppler flow imaging for the early detection of non-pregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *Journal Dairy Science*, 96: 6461-6472, 2013.