

**DETERMINACION DE PROGESTERONA MEDIANTE UN ENSAYO  
INMUNOENZIMATICO PARA TOMA DE DECISIONES DE MANEJO REPRODUCTIVO Y  
DETERMINACION DE ESTAS PERDIDAS EN VACAS DE DOBLE PROPOSITO  
MANTENIDAS EN CLIMA TROPICAL <sup>a</sup>**

**José Juan González Delon <sup>b</sup>  
Alejandro Villa Godoy <sup>c</sup>  
Heriberto Román Ponce <sup>d</sup>**

**RESUMEN**

Los objetivos fueron evaluar un ensayo inmunoenzimático (EIE) para determinar progesterona (P4) en leche para confirmar el estro, diagnosticar y determinar las pérdidas reproductivas entre el estro y los 45 días posteriores a la inseminación artificial (IA) en vacas de doble propósito. Se realizaron dos experimentos. En el experimento 1, se usó un diseño completamente al azar (n=47), se tomaron en forma simultánea muestras de leche y sangre para ser analizadas por el EIE y por el radioinmunoanálisis (RIA) para determinar P4 al momento del estro y a los 23 ± 1 días posteriores. Con respecto al RIA, el EIE tuvo un 7.1% de error para confirmar el estro y un 4.3% de error para la gestación. En el experimento 2, se usó un diseño completamente al azar sin tratamientos ni restricciones (n=47), se tomaron muestras de sangre por punción de la vena yugular al momento del estro y a los 23 ± 1 días posteriores a la IA. Con base en el RIA los datos indicaron que el EIE determinó 0% de error en la confirmación de estros, mientras que el 92% de las pérdidas reproductivas ocurrieron entre la IA y el día 23±1 posterior a la IA.

**PALABRAS CLAVE:** Vacas doble propósito, Ensayo inmunoenzimático, Radioinmunoanálisis, Estro, Diagnóstico de gestación, Progesterona, Pérdidas reproductivas.

**Tec. Pecu. Mex. Vol. 34 No. 3 (1996).**

La detección del estro y un diagnóstico precoz de la gestación son aspectos importantes en el manejo reproductivo del ganado bovino. Así como, la precisión en la detección del estro es esencial para tener éxito en cualquier programa de inseminación artificial. Las fallas en la observación (1,2,3,4), así como en la interpretación (5, 6) de los signos de estro resultan en pérdidas económicas significativas (7,8).

Se ha estimado que del 3 al 50% (9,10,11,12,13,14,15) de los estros en vacas lecheras no son detectados, atribuyéndose este problema a estros silenciosos (16,17). La principal utilidad del diagnóstico de gestación en la vaca productora de leche, es facilitar el reconocimiento temprano de la vaca no gestante, y evitar pérdidas en la producción como resultado de infertilidad. Por

otro lado, en la industria lechera, los altos incrementos de los costos en la producción, aumentan la importancia de contar con un diagnóstico precoz y preciso de gestación (18,19) que permita detectar los problemas de infertilidad (20). Las primeras investigaciones realizadas con progesterona (P4) en leche permitieron proponer que podría ser usada para realizar un diagnóstico de gestación (21). Posteriormente, varios investigadores usaron el radioinmunoanálisis (RIA) para correlacionar la concentración de P4 en leche y en plasma (5,22), con objeto de monitorear el estado reproductivo de la vaca y realizar un diagnóstico de fertilidad (23,24,25). Por otro lado, existe información que indica que los ensayos inmunoenzimáticos (EIE), al ser usados para determinar niveles de P4 en leche, pueden ser procedimientos útiles en la obtención de información referente al monitoreo de la actividad ovárica (26,27,28). Entre los usos de importancia de los EIE se encuentran la verificación de vacas con signos dudosos de estro (29), así como método de

<sup>a</sup> Recibido para su publicación el 12 de enero de 1996

<sup>b</sup> Campo Experimental Ixtacuaco, SAGAR-INIFAP, Apartado Postal 162, Martínez de la Torre, Ver. C.P. 93600

<sup>c</sup> CIRGOC, División Pecuaria, SAGAR-INIFAP, Apartado Postal 90, H. Cárdenas, Tab. C.P. 86500

<sup>d</sup> CIRGOC, División Pecuaria, SAGAR-INIFAP, Apartado Postal 1224, Veracruz, Ver. C.P. 91700.

diagnóstico de gestación entre los 21 y 24 días posteriores al servicio. Además, permite confirmar vacas que no gestaron y de esta manera argumentar que han ocurrido fallas en la detección del estro, de la ovulación, de fecundación, disfunción endocrina, incremento de la mortalidad embrionaria, y a las aberraciones genéticas y del canal reproductivo (30, 31, 32,33).

La mortalidad embrionaria representa potencialmente la mayor pérdida por concepto de ingresos para el productor de leche con relación al productor de ganado de carne (34). Los principales factores implicados en la mortalidad embrionaria son los aspectos genéticos, ambientales y endocrinos(33,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44). Aproximadamente, entre el 25 y 40% de los embriones se pierden en las especies domésticas, y el período crítico para que ocurran las primeras pérdidas reproductivas es inmediatamente después del apareamiento (35,39,45,46,47,48), mientras que entre el 63 al 80% de las muertes embrionarias tempranas, ocurren entre los días 6 y 19 después de la IA (33,38,41,49,50). Además, entre el 7.2 y 12.5% de las pérdidas reproductivas por causa de mortalidad embrionaria después de los 23 días de la IA, ocurren generalmente después del día 28 de la IA, y se deben a una disfunción endocrina del cuerpo lúteo, o bien a procesos infecciosos específicos del aparato reproductor (34,51).

Los objetivos generales de los experimentos fueron, evaluar un EIE para confirmar el estro y diagnosticar precozmente la gestación, así como determinar las pérdidas reproductivas entre el estro y los 45 días posteriores a la IA en vacas de doble propósito.

Los objetivos específicos para el experimento 1 fueron : a) Determinar la eficacia de un EIE para confirmar vacas en estro; b) Determinar la eficacia del EIE para diagnosticar la gestación a los  $23 \pm 1$  días; c) Examinar la eficacia del EIE diseñado para determinar niveles de progesterona en leche,

como herramienta de manejo reproductivo en un hato de vacas de doble propósito. Los objetivos específicos para el experimento 2 fueron : a) Determinar con el uso del RIA la proporción de vacas de doble propósito detectadas en estro erróneamente; b) Determinar las pérdidas reproductivas entre el estro y los  $23 \pm 1$  días posteriores a la IA; c) Determinar las pérdidas reproductivas entre los  $23 \pm 1$  días y los 45 días posteriores a la IA.

Los dos estudios se efectuaron en un rancho comercial del municipio de Papantla, Ver. La región tiene una precipitación anual de 1,200 mm., temperatura promedio diaria de 24 C y una altitud de 180 msnm. Se utilizaron 47 vacas multíparas lactando, con diferente grado de cruzamiento de *Bos taurus* X *Bos Indicus*, sanas y que no presentaron problemas al parto. Las vacas pastorearon en potreros de Estrella de Africa (*Cynodon plectostachyus*) y tuvieron libre acceso a suplementación mineral y agua.

La detección del estro se efectuó a partir del día 5 posparto, durante tres períodos diarios de observación, realizados durante la ordeña (07:00 a 10:00 h), al medio día (12:00 a 13:00 h) y por la tarde (17:00 a 18:00 h). Las vacas fueron inseminadas artificialmente en forma convencional entre 12 y 18 h después de observadas por primera vez en estro. Las vacas que no resultaron gestantes al primer servicio de IA y que presentaron nuevamente signos de estro, se les inseminó por segunda ocasión. El diagnóstico de gestación fue por palpación rectal a los 45 días después del último servicio.

En el experimento 1, se utilizaron 47 vacas, en un diseño completamente al azar, y conforme presentaron el primer estro se asignaron en forma alterna a los siguientes tratamientos: grupo 1 (n=24), se utilizó un EIE para confirmar estros (día 0) y diagnosticar gestaciones precozmente (día  $23 \pm 1$ ). El grupo 2 (n=23) fue el testigo. Las vacas de ambos grupos fueron manejadas

en forma similar. A todas las vacas del grupo 1, se les tomó una muestra de leche residual al momento de la IA para determinar los niveles de P4 por medio del EIE (29). Independientemente de los resultados determinados por el EIE, todas las vacas fueron inseminadas artificialmente al momento del estro (día 0). Posteriormente, a los  $23 \pm 1$  días después de la IA se les tomó otra muestra de leche residual, cuyos niveles altos de P4 indicaron gestación ( $> 1$  ng/ml de suero del RIA). Simultáneamente a la toma de muestras de leche residual, al momento de la IA y a los  $23 \pm 1$  días se colectaron muestras de sangre por punción de la vena yugular, para obtener muestras de suero y determinar la concentración de P4 por medio del RIA (52). Sin embargo, retrospectivamente se simuló con base en los resultados del EIE, la decisión de inseminar o no las vacas del grupo correspondiente. Los efectos de dicha decisión fueron determinados por el porcentaje de gestación a los  $23 \pm 1$  y 45 días posteriores a la IA. Los criterios usados para el grupo EIE fueron : a) En el día 0, si la P4 determinada por RIA ( $>1$  ng/ml), la vaca no fue inseminada. Por el contrario, si la P4 fue baja ( $< 1$  ng/ml) la vaca fue inseminada; b) en el día  $23 \pm 1$  los niveles altos de P4 indicaron gestación, mientras que niveles bajos indicaron ausencia de gestación. El grupo 2 (n=23) fue el testigo, en el cual, todas las vacas fueron inseminadas artificialmente al momento del estro. A todas las vacas al momento del estro y a los  $23 \pm 1$  días posteriores a la IA se les colectaron muestras de sangre por punción de la vena yugular para obtener muestras de suero y posteriormente, mediante la concentración de P4 para confirmar por RIA si las vacas estuvieron en estro ( $< 1$  ng/ml de suero). Las proporciones de estros detectados erróneamente y el porcentaje de vacas gestantes de ambos grupos se analizaron por ji cuadrada (53). En el experimento 2, se usaron 47 vacas,

en un diseño completamente al azar, sin tratamientos ni restricciones. De todas las vacas se tomaron muestras de sangre por punción de la vena yugular al momento de la IA (día 0) y a los  $23 \pm 1$  días después de IA. De estas muestras se obtuvo el suero y a partir de este se determinaron las concentraciones de P4 por medio de un RIA (52). Las concentraciones de P4 ( $> 1$  ng/ml de suero) de las muestras colectadas al momento de la IA indicaron la proporción de vacas detectadas erróneamente en estro. Posteriormente, la P4 ( $> 1$  ng/ml de suero) cuantificada el día  $23 \pm 1$  posterior a la IA, permitió efectuar el diagnóstico de gestación. La proporción de vacas gestantes, determinada de esta forma, con relación al número de vacas inseminadas artificialmente, permitió cuantificar las pérdidas reproductivas ocurridas entre la IA y los  $23 \pm 1$  días posteriores. Las concentraciones altas (equivalente  $> 1$ ng/ml de suero) de P4 en el día  $23 \pm 1$ , seguida de un diagnóstico de gestación por vía rectal negativo, se consideró como evidencia de pérdida reproductiva entre  $23 \pm 1$  y 45 días. De esta manera, se permitió conocer las pérdidas reproductivas entre el estro y los 45 días posteriores a la IA. La estadística empleada en este caso fue descriptiva. El EIE al determinar los niveles de P4, tuvo un error del 7.1% para confirmar estros y del 4.3% para diagnosticar gestaciones en forma precoz (Cuadro 1). En el caso de la detección del estro, el EIE determinó niveles altos de P4 en leche de dos de las vacas al momento de ser inseminadas, contrariamente el RIA indicó una concentración baja de P4, sin embargo, estas vacas después de haber sido inseminadas volvieron a presentar estro a los 23 y 49 días, respectivamente. En el Cuadro 2, se muestra que las vacas del grupo del EIE requirieron 1.6 servicios por concepción, así como el 71% de las vacas resultaron gestantes, mientras que las vacas del grupo testigo requirieron 2.1 servicios para poder concebir, y el 65% de las vacas resultaron

**CUADRO 1.-PORCENTAJE DE DETECCION DE ESTROS Y DIAGNOSTICO PRECOZ DE GESTACION A LOS 23±1 DIAS POSTERIORES A LA INSEMINACION ARTIFICIAL CON EL USO DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN VACAS DE DOBLE PROPOSITO**

	RIA	EIE	PORCENTAJE DE ERROR DEL EIE
CONFIRMAR ESTROS, %	100	92.9 (26)	7.1 (2)
DIAGNOSTICO DE GESTACION, %	100	95.7 (22)	4.3 (1)

\* Se asumió que progesterona > 1 ng/ml de suero = gestación (23±1 días posteriores a la IA).  
( ) Número de observaciones.

gestantes. En el Cuadro 3, se muestra que del total de las vacas que resultaron gestantes al primer y segundo servicio, requirieron 1.8 y 2.2 servicios por concepción y una tasa de concepción del 55% y 45%, respectivamente. Por consiguiente, después de la aplicación de 1 ó 2 servicios de IA, el 50% de las vacas que participaron en este experimento resultaron gestantes, requiriendo 2.0 servicios por concepción (Cuadro 3).

Al considerar la concentración sérica de P4, determinada a través del RIA, no ocurrieron errores en la detección del estro (Cuadro 1). Por otro lado, el 32% de las vacas utilizadas en este estudio permanecieron sin gestar, después de haber recibido 1 ó 2 servicios de IA. Además, se detectó que la mayoría de las pérdidas reproductivas (92%) ocurrieron durante los 23 ± 1 días posteriores a la IA, y el 8% restante entre los 24 y 45 días posteriores a la IA (Cuadro 4). Los porcentajes de error (7.1%) en la

detección de estros, así como el diagnóstico precoz de gestación (4.3%), realizado con vacas de doble propósito son similares a los de las vacas lecheras, en donde una alta proporción de vacas «detectadas» en estro, realmente se encuentran en la fase de diestro o bien padecen de algún problema endocrino (26,27,29). Las diferencias observadas (7.1%) en la confirmación del estro entre el EIE y el RIA, se debió a que dos vacas que el RIA confirmó en estro al determinar baja concentración de P4, mientras que el EIE registró valores elevados de P4, indicando que no estaban en estro. Dichas vacas fueron inseminadas artificialmente y no resultaron gestantes; lo que permite, aunque de ninguna manera en forma definitiva, suponer que quizá en estos dos casos el EIE fue más certero que el RIA. De manera similar, se determinó en 10 hatos de vacas lecheras que el 25% de las vacas tuvieron altos niveles de P4 al ser detectadas visualmente con manifestaciones de estro

**CUADRO 2.- USO DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN LA DETECCION DE ESTROS Y DIAGNOSTICO PRECOZ DE GESTACION EN LA EFICACIA REPRODUCTIVA DE VACAS DE DOBLE PROPOSITO.**

	EIE		TESTIGO	
	NUMERO	%	NUMERO	%
SERVICIOS POR CONCEPCION	1.6		2.1	
VACAS GESTANTES (45-50 DIAS)	17	71	15	65
VACAS QUE PERMANECIERON SIN GESTAR	7	29	8	35

**CUADRO 3.- NUMERO DE SERVICIOS POR CONCEPCION Y TASA DE CONCEPCION EN VACAS DE DOBLE PROPOSITO**

	N	%
PRIMER SERVICIO	1.8	55
SEGUNDO SERVICIO	2.2	45
TOTAL	2.0	50

(29). A pesar de que la eficacia del RIA ha sido ampliamente documentada, no se puede ignorar que en este tipo de estudios el EIE sea más sensible y seguro que el RIA. La duda plasmada anteriormente, no puede ser resuelta debido a que en la literatura disponible no se encontró ningún experimento que aclarara cual de los procedimientos, es más preciso. Debido a ello, el criterio usado para evaluar el EIE fue el de comparar los resultados obtenidos con dicho procedimiento, contra aquellos determinados en forma simultánea mediante el RIA (día del estro y día  $23 \pm 1$  posterior a la IA) y confirmados con palpación rectal efectuado el día 45 posterior a la IA. La palpación rectal permitió confirmar que al menos en el caso de los diagnósticos de gestación, el RIA fue más preciso (100%) que el EIE. Sin embargo, estos datos indican la magnitud del problema de la detección de estros en vacas lecheras, y en forma indirecta, permiten considerar a los EIE como un elemento potencialmente importante para confirmar el estro en vacas. De ser posible lo anterior, el uso de los EIE puede reducir los costos por concepto de IA

y aumentar la tasa de concepción por servicio (29). Por lo tanto, en el futuro será conveniente planear los efectos del uso de un EIE para estudios que aclaren esta duda. El uso del EIE como herramienta de manejo no mejoró ( $p > .05$ ) el comportamiento reproductivo de las vacas de doble propósito, ya que los servicios por concepción, porcentajes de vacas sin gestar no difirieron ( $p > .05$ ) con las del grupo testigo.

En los estudios consultados (26,27,29) y en el presente, se empleó el EIE para diagnosticar gestación durante la primera mitad de la vida del embrión, a pesar de varios factores ya discutidos en la revisión de literatura que pueden contribuir a inducir lecturas falsas positivas con el uso de dicho ensayo. Debido a ello, en todos los trabajos el EIE registró errores de diagnóstico, sin embargo, se ha logrado obtener un 95% de aciertos en el diagnóstico de gestación con el uso de un EIE entre los 21 y 24 días posteriores a la IA. A pesar de lo anterior, no es posible concluir sobre la inutilidad del EIE, hasta no examinar su eficacia en etapas posteriores ( $> 23 \pm 1$  días) del desarrollo embrionario.

**CUADRO 4.- PORCENTAJE DE LAS PERDIDAS REPRODUCTIVAS ENTRE EL ESTRO (DIA 0) Y LOS 45 DIAS POSTERIORES A LA INSEMINACION ARTIFICIAL EN VACAS DE DOBLE PROPOSITO DETERMINADAS POR EL RADIOINMUNOANALISIS <sup>a</sup>**

	NUMERO	%
ESTRO ERRONEAMENTE DETECTADO	0	0
PERDIDAS REPRODUCTIVAS TEMPRANAS ( $23 \pm 1$ DIAS)	24	92
PERDIDAS REPRODUCTIVAS TARDIAS ( $23 \pm 1$ A 45 DIAS)	2	8
PERDIDAS REPRODUCTIVAS TOTALES	26	100
VACAS NO GESTATES (DESPUES DE 1 ó 2 SERVICIOS)	15	32

a = (n=47)

En el experimento 2, el número de servicios por concepción son similares a los encontrados en vacas de doble propósito (54) y en ganado especializado en producción de leche (55). De acuerdo al RIA, no ocurrieron errores en la detección del estro, consecuentemente todas las vacas presentadas para IA estaban verdaderamente en estro (Cuadro 4). Lo anterior indica que en hatos de doble propósito con aproximadamente 50 vacas, donde las observaciones para detectar estros son frecuentes, ésta no es una causa importante de infertilidad, como lo es en ganado especializado en producción de leche, donde a pesar de detecciones meticulosas del estro, el porcentaje de vacas identificadas erróneamente en estro, llega a ser entre 5 y 7% como lo indican evidencias circunstanciales (56,57). Sin embargo, la precisión en la detección del estro en vacas, realizado por toros celadores, presentan altos porcentajes de concepción comparados con aquellos que solamente fueron observadas por un vaquero (58). La presente información, no es extrapolable a ranchos con mayor número de vacas, ya que se ha documentado que los problemas de detección del estro y reproductivos en general, aumentan con el número de vacas presentes en un establo lechero (57). En este estudio no se determinó con que frecuencia no son detectadas todas las vacas que están en estro. Al respecto, se ha documentado que entre el 17 y el 50% de las vacas lecheras en estro, no son detectadas mediante 2 ó 3 observaciones diarias (9,57,59,60,61). Por lo tanto, es importante que en estudios futuros se determine si este tipo de errores en la detección de estros es una fuente importante de variación del comportamiento reproductivo de las vacas de doble propósito, ya que tampoco se encontraron trabajos que aborden este tema. Además, el 32% de las vacas utilizadas en este estudio, permanecieron sin gestar después de haber

recibido 1 ó 2 servicios de IA (Cuadro 4). Esta información indica que la baja tasa de concepciones también determina en forma el comportamiento reproductivo del ganado de doble propósito, contribuyendo a prolongar los períodos entre partos, cuya duración es afectada en forma similar por el anestro posparto (62).

Se detectó que la mayoría de la pérdidas reproductivas (92%) en vacas de doble propósito ocurrieron durante los  $23\pm 1$  días posteriores a la IA (Cuadro 4). Esta información, es la primera en su género, y coincide con la existente en ganado lechero especializado (2,34,38,51,) y en ganado productor de carne (36,39,41,49,50,). Además, se ha documentado que en el ganado cruzado amamantando y en las hembras adultas, la mortalidad embrionaria se incrementa con la edad de las vacas (31,63), por lo tanto, la función zootécnica y probablemente las razas o grupos genéticos no son factores importantes que alteren el hecho de que la mayor parte de pérdidas reproductivas en hembras bovinas ocurran en fases tempranas con relación al momento de la IA. Se puede concluir que en vacas de doble propósito la detección errónea del estro no parece ser una causa importante de infertilidad, en contra de lo observado en ganado lechero especializado donde son frecuentes las vacas señaladas en estro sin estarlo.

## **IMMUNOENZYMATIC ASSAY USED TO DETERMINE REPRODUCTIVE LOSSES AND AS A TOOL FOR REPRODUCTIVE MANAGEMENT DECISION-TAKING IN DUAL-PURPOSE COWS IN THE TROPIC**

### **SUMMARY**

The objective of the present study was to evaluate an immunoenzymatic assay (IEA) to both confirm estrus and early pregnancy diagnosis, and the reproductive losses occurring between estrus and 45 days post-artificial insemination (AI) in dual-purpose cows. Two experiments were conducted, and in both of them, the detection of estrus was done three times per day; AI was done using conventional methods and pregnancy diagnosis was done by rectal palpation practiced at 45 days

post-AI. In experiment 1, a completely random design was used for simultaneous samples of milk and blood taken for progesterone determinations at time of estrus and at 23±1 days post-AI. In comparison to radioimmunoassay (RIA), IEA presented 7.1% of failures at detecting estrus, and 4.3% of error at detection gestation. In experiment 2, a completely random design was used with no treatments and no restrictions, blood samples were taken by puncture of jugular vein at the time of estrus and 23±1 days post-AI. In comparison to RIA, the IEA results showed 0% of error in the confirmation estrus, and the majority of the reproductive losses (92%) occurred between the day of AI and 23±1 days post AI.

**KEY WORDS:** Dual-purpose cows, Immunoenzymatic assay, Radioimmuno assay, Estrus, Pregnancy diagnosis, Progesterone, Reproductive losses.

## REFERENCIAS

1. Barr H L. Influence of estrus detection on days in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 1974; 70:1471.
2. Foote R H, Oltenucu E A B, Kummerfeld H L, Smith R D, Riek P M, Braun R K. Milk progesterone as a diagnostic aid. *Br. Vet. J.* 1979; 135: 550.
3. Rounsaville T R, Oltenucu P A, Milligan R A, Foote H. Effect of heat detection, conception rate, and culling policy on reproductive performance in dairy herds. *J. Dairy Sci.* 1979; 62:1435.
4. Spalding R W, Everett R W, Foote R H. Fertility in New York artificially inseminated Holstein herds in dairy herd improvement. *J. Dairy Sci.* 1975; 58:718.
5. Hoffman B, Günzler O, Hamburger R, Schmidt W. Milk progesterone for fertility control in cattle; methodological approaches and present status of application in Germany. *Br. Vet. J.* 1976; 132:469.
6. Reimers T J, Smith R D, Newman S K. Management factors affecting reproductive performance of dairy cows in the Northeastern United States. *J. Dairy Sci.* 1985; 68:963.
7. Britt J H. Enhanced reproduction and its economic implications. *J. Dairy Sci.* 1985; 68:1585.
8. Pelissier C L. Herd breeding problems and their consequences. *J. Dairy Sci.* 1972; 55:385
9. Britt J H. Strategies for managing reproduction and controlling heat problems in groups of cows. *J. Dairy Sci.* 1977; 60:1345.
10. Hruska K, Veznik Z. Significance of progesterone determination in milk. *Endo. Experimentalism.* 1983; 17:207.
11. Laitinen J, Remes E, Tenhunen M, Hanninen O, Alanko M. Milk progesterone in Finnish dairy cows: a field study on the control of artificial insemination and early pregnancy. *Br. Vet. J.* 1985; 141:297.
12. Pennington J A, Schultz L H, Hoffman W F. Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and day 24 postbreeding: field study in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1985; 68:2740.
13. Reimers T J, Smith R D, Foote R H. Milk progesterone testing to determine reproductive status of cows. XI Int. Congr. Dis. Cattle. E. Mayer, ed. Bregman Press. 1980; 906. Haifa, Israel.
14. Smith D R. Field trials of RPT<sup>TM</sup> rapid progesterone test for bovine milk. Dept. of Dairy Science, 1986, mimeograph.
15. Wettemann R P, Bazer F W, Thatcher W W, Hoagland T A. Environmental influences on embryonic mortality. 10th International Congress on animal reproduction and artificial insemination. 1984; Vol. IV: XIII-26 Uni. Ill. USA.
16. De Kruijff A. Factors influencing the fertility of a cattle population. *J. Reprod. Fert.* 1978; 54:507.
17. Pelissier C L. Dairy cattle breeding problems and their consequences. *Theriogenology.* 1976; 6:575.
18. Heap R B, Holdworth R J, Gadsby J E, Laing J A, Walters D E. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *Br. Vet. J.* 1976; 132:445.
19. Heap R B, Linzell J L, Laing J A. Pregnancy diagnosis in cows: use of progesterone concentration in milk. *Vet. Rec.* 1974; 94:160.
20. Lamming G E, Bulman D C. The use of milk progesterone radioimmuno assay in the diagnosis and treatment of subfertility in dairy cows. *Br. Vet. J.* 1976; 132:507.
21. Laing J A, Heap R B. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br. Vet. J.* 1971; 127:XX.
22. Heap R B, Gwyn M, Laing J A, Walters D E. Pregnancy diagnosis in cows, changes in milk progesterone concentration during the estrous cycle and pregnancy measured by a rapid immunoassay. *J. Agric.* 1973; 81:151.
23. Ball P J H, Jackson N W. The fertility of dairy cows inseminated on the basis of milk progesterone measurements. *Br. Vet. J.* 1979; 135: 537.
24. Dobson H, Fitzpatrick R J. Clinical application of the progesterone-in-milk test. *Br. Vet. J.* 1976; 132:538.
25. Foote R H. Hormones in milk that may reflect reproductive changes. In *Animal Reproduction (3). Beltsville Symposia in Agricultural Research. Northeastern Region. Science and Education Administration. United States Department of Agriculture.* 1978; 111.
26. Nebel R L. When should you use a cowside milk progesterone test? *Hoard's Dairyman.* 1986; June, 10.
27. Nebel R L. On-farm progesterone tests. *J. Dairy Sci.* 1988; 71:1682.
28. Worsfold A I, Booth J M, Wells P W, Huddart A C, Stanley C J. The evaluation of a new rapid milk progesterone test as an aid improving dairy fertility. *Br. Vet. J.* 1987; 143:83.
29. Nebel R L, Wittier W D, Caseil B G, Britt J H. Comparison of on-farm and laboratory milk progesterone assays for identifying error in detection of estrus and diagnosis of pregnancy. *J. Dairy Sci.* 1987; 70: 1471.
30. Booth J M, Holdworth R J. The establishment and operation of a central laboratory for pregnancy testing in cows. *Br. Vet. J.* 1976; 132:512.
31. MacFarlane J S, Booth J M, Deas D W, Lowman B G. Pregnancy test and evaluation of embryonic and fetal mortality based on progesterone concentration in fore-milk. *Vet. Rec.* 1977; 100; 565:32.
32. Pope G S, Majzlik I, Ball P J, Leaver J D. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Br. Vet. J.* 1976; 132:497.
33. Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fert.* 1978; 54:483.
34. Biggers B G, Buchanan D S, Wettemann R P, Zavy M T, Geisert R D. Effect of heat stress on early embryonic development and survival in the cow. *Animal Science Research Report.* 1986; 303.
35. Bishop M W H. Paternal contribution to embryonic death. *J. Reprod. Fert.* 1964; 7:383.
36. Dunlap S E, Vincent C K. Influence of postbreeding thermal stress on conception in dairy cattle. *J. Anim. Science.* 1971; 32:1216.
37. Linares T. Embryonic development in repeat breeder and virgin heifers seven days after insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 1981/1982; 4:189.
38. Maurer R R, Echterkamp S E. Repeat-breeder females in beef cattle: influences and causes. *J. Anim. Sci.* 1985; 61:624.

39. Putney D J, Drost M, Thatcher W W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed at elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 1988; 30:195
40. Sreenan J M, Diskin M G. Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. *The Veterinary Record*. May 28, 1983; 112:517.
41. Stott G H, Williams R J. Causes of low breeding efficiency in dairy cattle associated with seasonal high temperatures. *J. Dairy Sci.* 1962; 45:1369.
42. Thatcher W W. Effects of seasonal climate and temperature on reproductive and lactation. *J. Dairy Sci.* 1974; 57:360.
43. Villa-Godoy A, Milian F. Asociación del grosor de la grasa subcutánea al parto, paridad, estado energético y producción láctea con algunas funciones y tasas reproductivas en vacas Holstein. *Mem. XIV Congr. Nal. de Buiatría.* 1988; 4. Querétaro, Qro.
44. Ayalon N. The repeat breeder problem. 10th. International congress on animal reproduction and artificial insemination. 1984. Vol. IV p.111. Urbana. Ill. USA.
45. Jainudeen MR, Hafez E S E. Reproductive failure in females. In: *Reproduction in Farm Animals*. 5th. ed. Lea and Febiger, Philadelphia, USA. p 649.
46. Maurer R R, Echterkamp S E. Hormonal asynchrony and embryonic development. *Their.* 1982; 17:11.
47. Smith M F, Nix K J, Karma D C, Amoco M S, Heron M A, Wiltbank J N. Fertilization rate and early embryonic loss in Brahman crossbred heifers. *J. Anim. Sci.* 1982; 54:1005.
48. Maurer R R, Chenault J R. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. *J. Anim Sci.* 1983, 56:1186.
49. Roche J F, Boland M P, McGeady T A, Ireland J J. Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. *Veterinary Record* 1981; 109:401.
50. Bulman D C, Lamming G E. The use of milk progesterone analysis in the study of estrous detection herd fertility and embryonic mortality in dairy cows. *Br. Vet. J.* 1979; 135:559.
51. Kummerfeld H L, Ottenacu E A B, Foote R H. Embryonic mortality in dairy cows estimated by nonreturns to service, estrus and cyclic milk progesterone patterns. *J. Dairy Sci.* 1978; 61:1773.
52. Jiménez F, Galina C S, Ramírez B, Navarro-Fierro R. Comparative study of the concentrations of peripheral progesterone before and after PGF2 injection between *Bos-taurus* (Brown Swiss) and *Bos-indicus* (Indobrazil) in the tropics. *Anim. Reprod. Sci.* 1985; 9:333.
53. Stell R G D, Torrie J H. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. Segunda edición (Primera español). Colombia. Mc Graw Hill. 1985. 622.
54. Sánchez R S, Rebolledo A M, Castillo R H. Comportamiento reproductivo de vacas. Módulo de doble propósito del Campo Experimental "La Posta". Paso del Toro, Ver. SARH-INIFAP. 1989, 39.
55. Kelly J W, Holman J R. A Modified herd reproductive status program for South Carolina dairy herds. *J. Dairy Sci.* 1975; 58:261.
56. Baker A A. Comparison of heat detectors and classical methods for detecting heat in beef cattle. *Aust. Vet. J.* 1965; 360.
57. Pelissier C L. Fertility problems under large herd management. In: Wilcox C J, Van Horn H H, ed. *Uni. of Florida Press, Gainesville, USA.* 1978: 201.
58. Foote R H. Estrus detection and estrus aids. *J. Dairy Sci.* 1975; 50: 248.
59. Villa-Godoy A, González D J J. Factores técnicos que limitan la productividad del ganado de doble propósito en los trópicos. 3era. Reun. Anual CIRGOC-VER. SARH-INIFAP. 1990; 229.
60. Villa-Godoy A, Hughes T L, Emery R S, Chapin L T, Fogwell R L. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1988; 71:1063.
61. Villa-Godoy A, Hughes T L, Emery R S, Enright W J, Ealy A D, Zinn S A, Fogwell R L. Energy balance and condition influence luteal function in Holstein heifers. *Dom. Anim. Endocrinol.* 1990; 7:135.
62. Avila C J M, Ortega S J A, Avila D A, Pérez S J M, Villagómez C J A. Producción de leche con ganado cruzado en pastoreo rotacional. XII Día del Ganadero del Campo Experimental "La Posta", Paso del Toro, Toro, Ver. SARH-INIFAP. 1984; 23.
63. Biggers J D. Problems concerning the uterine causes of embryonic death with special reference to the effects of aging of the uterus. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1968; 8:27.