

Diagnóstico de gestación en vacas mestizas mediante la determinación de progesterona por radioinmunoanálisis en leche descremada¹

Diagnosis of pregnancy in crossbreed cows based on the progesterone concentration of skim milk by radioimmunoassay

Deisy Medina²
Carlos González³
Ruddy Villalobos⁴
Belkys Bracho⁴

Resumen

Se evaluó la eficiencia del diagnóstico de gestación determinando los niveles periféricos de progesterona en leche descremada mediante la técnica de Radioinmunoanálisis (RIA). Se utilizaron 207 vacas, con uno a seis partos, mestizas con predominancia racial Brahman, Pardo Suizo y Holstein, ordeñadas mecánicamente dos veces al día y pertenecientes a la finca La Esperanza, Municipio Rosario, Estado Zulia, Venezuela. Las muestras de leche fueron tomadas en el ordeño de la tarde, entre los días 19 al 24 después del servicio por inseminación artificial (A.I). El método de diagnóstico por palpación rectal a los 42-75 días se usó como prueba comparativa. El análisis discriminante determinó que el nivel óptimo de la concentración de progesterona para animales gestantes fue de 0.50 ng/ml; concentraciones menores permitieron identificar los animales no gestantes. Los días 20 al 23 presentaron la mayor proporción de éxitos en el diagnóstico, siendo la eficiencia total de la prueba de 85.0%. El diagnóstico fue significativamente superior ($P < 0.01$) para determinar los animales no gestantes, 94.9% contra 79% de éxito para los gestantes. La tasa de error en el diagnóstico fue de 1.93%. Un trece por ciento de casos con progesterona positiva entre los días 19-24 y no gestantes al momento de la palpación, son atribuibles a mortalidad embrionaria. Mediante análisis de varianza, se determinó el efecto de la época

Recibido: 15 - 10 - 93. • Aceptado: 04 / 09 / 94.

1. Proyecto financiado por CONDES y el Instituto de Investigaciones Agronómicas, con apoyo de la AEIA/FAO (Viena).
2. Departamento de Química. Facultad de Agronomía. LUZ.
3. Departamento de Zootecnia. Postgrado en Producción Animal. Facultad de Agronomía. Apartado 15205. Maracaibo 4005 - Venezuela.
4. Departamento de Estadística. Facultad de Agronomía. LUZ

del servicio, número de parto, tipo racial, el lapso entre el día del servicio-muestra y el diagnóstico de gestación sobre los niveles de progesterona. Sólo fueron significativos ($P < 0.05$) la época de servicio y número de parto, tanto en animales gestantes como no gestantes. Los resultados confirman la eficiencia del diagnóstico precoz de no gestación entre 20-23 días después del servicio mediante la determinación de progesterona en leche descremada. Se recomienda la utilización de esta prueba para identificar rápidamente los animales no gestantes con el fin de proceder a realizar un nuevo servicio o corregir el problema del anestro post-servicio.

Palabras claves: Bovino, progesterona, leche descremada, gestación.

Abstract

Progesterone level (Pg) on skim milk was determined by RIA, and used to evaluate pregnancy diagnosis of 207 crossbred cows from La Esperanza dairy farm of Universidad del Zulia. Cows were produced from a crossbreeding program involving Brahman, Holstein and Brown Swiss breeds. Milk samples were taken on afternoon milking from days 19 to 24 after A.I. Pregnancy was confirmed by rectal palpation at 42-75 days after service. Use of a discriminating linear function method allowed for establishing a Pg level greater or equal to 0.5 ng/ml as the optimum concentration to confirm the pregnancy status. Overall diagnosis efficiency was 85 percent and worked better on animals tested 20-23 days after service. Diagnosis of non-pregnant were significantly more accurate than did for pregnancy (94.9 Vs 79.0%, respectively $P < 0.01$) 19-24 days after A.I. 1.93% of cows with Pg lower than 0.5 ng/ml resulted pregnant at palpation whereas 13% of cows with Pg higher than 0.5 ng/ml resulted non pregnant when palpated 25-45 days after Pg determination. This later event was attributed to embryonic mortality. Analysis of variance was used to determine the effect of time of service, calving number, crossbreed group, sampling day and pregnancy diagnosis on Pg levels. Pg was only affected ($P < 0.05$) by time of service and calving number in either pregnant or non pregnant animals. Results showed the efficiency of the test for early diagnosis of non pregnant cows within 20-23 days after service. The test is recommended for detection of early non pregnant animals and for anestrous post service control.

Key words: Bovine, progesterone, skim milk, pregnancy.

Introducción

Habitualmente el diagnóstico de gestación depende de la observación del retorno en celo de los animales no gestantes y de la confirmación del estado de gestación por un poste-

rior examen clínico mediante palpación rectal, cuya precocidad y exactitud dependerá de la eficiencia del veterinario clínico (5,23). Sin embargo, la determinación de los niveles de

progesterona periférica especialmente en plasma, suero, leche entera o descremada, etc, utilizando la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) se ha revelado como uno de los métodos más precisos y precoces para establecer un diagnóstico de gestación en las diversas especies animales (6); incluso ha permitido lograr una exactitud del cien por ciento en el diagnóstico de no gestación en vacas (19).

La técnica ha mostrado ser menos eficiente para el diagnóstico de animales preñados; desde el momento temprano del diagnóstico hormonal hasta su posterior confirmación clínica por palpación rectal o hasta el

nacimiento de la cría, se ha reportado una variable incidencia de mortalidad embrionaria tardía (5) que influye en la precisión del diagnóstico de gestación.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los niveles óptimos de progesterona en leche descremada determinados mediante el RIA para el diagnóstico de gestación en vacas y el momento del muestreo más efectivo entre los días 19-24 después del servicio, comparado con el posterior examen clínico por palpación rectal en relación con el predominio racial, el número de partos y la época del servicio del animal.

Materiales y métodos

1. Características de la zona

La presente investigación fue realizada durante el año 1988 en la finca La Esperanza, propiedad de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. La temperatura media fue de 29.5°C con una mínima y máxima de 23.7 y 34.5°C respectivamente y una precipitación anual de 1048.4 ± 180 mm.

2. Animales experimentales

Se estudiaron 207 vacas mestizas, sometidas a ordeño mecánico dos veces al día, sin apoyo ni amamantamiento de la cría. Las vacas mestizas con predominancia racial Holstein (43.5%), Pardo Suizo (33.3%) y Brahman (23.2%) con 1, 2, 3 y 4 o más partos fueron suplementadas especialmente en época seca de acuerdo a su nivel de producción. Cada animal fue muestreado una

sola vez entre los días 19 al 24 después del servicio realizado por inseminación artificial con semen congelado. Se agruparon los animales en las épocas de servicio seca (meses de Enero-Abril); intermedia (Mayo-Agosto) y húmeda (Septiembre-Diciembre).

3. Muestras

Se tomaron muestras de leche de la primera fracción del ordeño de la tarde, del cuarto posterior derecho, obteniendo una fracción menos rica en grasa, se eliminaron las primeras descargas. Las muestras se colocaron en tubos de polipropileno usando azida de sodio al 0.1% como preservativo y se conservaron bajo refrigeración a 5°C. Las muestras se procesaron por duplicado aplicando la técnica de RIA utilizando la metodología especificada por Ramírez

(22). El análisis de la progesterona dio un coeficiente de variación intraensayo e interensayo de 8.46 y 13.05% respectivamente, cifras que se consideran bastante apropiadas (3, 25).

4. Palpación rectal

Todos los animales experimentales que no retornaron en celo, fueron examinados por palpación rectal a cargo de un médico veterinario especializado, entre los días 42 y 75 después del servicio. Este resultado fue contrastado con la cuantificación de la progesterona en leche descremada.

5. Determinación de la concentración óptima de progesterona para el diagnóstico de gestación

Una vez obtenidos los valores de las concentraciones de progesterona en las muestras de leche descremada de los 207 animales, se procedió a seleccionar entre los valores de 0.40, 0.50, 0.55 y 0.60 ng/ml el valor más satisfactorio para el diagnóstico de gestación y no gestación confirmado por palpación rectal, los días 19 al 24 después del servicio.

6. Distribución en grupos de acuerdo a la concordancia del diagnóstico por progesterona y por palpación rectal

Comparando los resultados de la palpación rectal con los niveles de progesterona menores o mayores de 0.50 ng/ml, los animales se clasificaron en cuatro grupos; los dos primeros con coincidencias de ambos diagnósticos y los dos restantes en los

cuales el diagnóstico por progesterona y por palpación no coincidían:

Grupo 1. Vacas con niveles de progesterona menores a 0.50 ng/ml y vacías a la palpación (negativas).

Grupo 2. Vacas con niveles de progesterona iguales o mayores a 0.50 ng/ml y preñadas a la palpación (positivas).

Grupo 3. Vacas con niveles de progesterona menores a 0.50 ng/ml y preñadas a la palpación.

Grupo 4. Vacas con niveles de progesterona iguales o mayores a 0.50 ng/ml y vacías a la palpación.

Estos cuatro grupos se combinaron de acuerdo a los niveles de progesterona para obtener la variable gestación, así los grupos 1 y 3 ($Pg < 0.50$ ng/ml) darían el diagnóstico de no gestación y los grupos 2 y 4 el de gestación ($Pg \geq 0.50$ ng/ml).

Para medir la efectividad real del diagnóstico por progesterona negativa y positiva, se utilizaron los grupos 1 y 2 (diagnóstico efectivo); los grupos 3 y 4 se consideraron como fallas del diagnóstico hormonal en el momento actual; el grupo 3 atribuido a errores en el manejo o en el procedimiento y el grupo 4, debido a diferencias entre el momento del diagnóstico por progesterona y la posterior comprobación por palpación rectal, atribuibles a una posible mortalidad embrionaria.

7. Procesamiento de las muestras

El equipo utilizado para procesar la progesterona en leche por RIA fue un MINI-ASSAY tipo 6-20 cuya eficiencia fue de 52.3%. Fueron em-

pleados kits suministrados por el convenio con el Ministerio de Energía y Minas y la Agencia Internacional de Energía Atómica y procesados de acuerdo con la metodología establecida en el Manual IAEA FAO (10). Se utilizó el RIA en fase sólida para progesterona, el cual se fundamenta en la competencia entre la progesterona presente en la muestra de leche descremada y la hormona marcada con I^{125} por un limitado número de sitios de unión al anticuerpo, el cual se encuentra adherido a la pared interna del tubo de polipropileno que traen los kits. La proporción de progesterona yodada unida al anticuerpo, está inversamente relacionada con la concentración de progesterona en la muestra de leche. Todos los componentes del ensayo se utilizaron a temperatura ambiente (10).

8. Metodología estadística

Se efectuó la distribución de los animales experimentales, tomando en cuenta las variables paramétricas: época del servicio, tipo racial, número de partos y el lapso entre el

servicio y la toma de muestra, para estudiar la relación entre ellas con el diagnóstico de gestación por la progesterona comparado con el resultado de la palpación rectal. Se aplicó la prueba chi-cuadrado (χ^2) para establecer la independencia entre las variables, el coeficiente de correlación de Pearson para determinar la asociación entre las variables estudiadas y la prueba de Z para conocer la significancia entre los resultados obtenidos del porcentaje de eficiencia del diagnóstico. El análisis de varianza para estudiar el efecto de las variables sobre el diagnóstico de gestación y sobre los niveles de progesterona se realizó usando un modelo factorial aditivo lineal. Se usó el análisis discriminante para estimar los niveles de progesterona en leche descremada, el cual admite el mejor valor para la clasificación de animales gestantes o no por niveles de progesterona, confirmados por palpación rectal (2, 16). Los datos del experimento fueron procesados con el SAS (26).

Resultados y discusión

1. Concentración óptima de progesterona para el diagnóstico

Se usó la función lineal discriminante para estimar los niveles de progesterona en leche descremada (2, 16). Para el estudio se fijaron concentraciones de progesterona de 0.40, 0.50, 0.55 y 0.60 ng/ml. Al aplicar el análisis discriminante, se obtuvo que el mayor porcentaje de animales diagnosticados efectivamente

como gestantes y no gestantes correspondió a 0.50 ng/ml, valor en el cual no se reportan animales mal clasificados. Para las otras concentraciones el porcentaje de animales mal clasificados oscila entre 2.9 y 3.3% (Cuadro 1). Valores similares han sido reportados por otros autores (1, 17, 20).

En animales gestantes, la media de progesterona fue de 2.34 ng/ml con una desviación estándar

Cuadro 1. Efectividad del diagnóstico de gestación utilizando diferentes niveles de progesterona mediante el estimado de la función lineal discriminante en vacas mestizas.

Niveles de progesterona (ng/ml leche)	Clasificación correcta de animales (%)		Animales n	Efectividad (%)	Animales mal clasificados
	No Gestantes	Gestantes			
0.40	94.5	75.4	170	82.1	2.9
0.50	94.9	78.9	176	85.2	0.0
0.55	88.2	77.8	170	82.8	2.9
0.60	87.2	77.7	169	81.6	3.4

de 1.95 para animales gestantes mientras que en 79 no gestantes la media de progesterona en leche descremada fue 0.29 ng/ml con una desviación estándar de 0.04 entre los días 19 al 24 post servicio. Se han señalado concentraciones de progesterona en leche descremada de 0.19 ± 0.03 ng/ml para diagnóstico de no gestación y 2.16 ± 0.1 ng/ml para diagnóstico de gestación (15).

El bajo porcentaje de animales en los cuales no coincide el diagnóstico negativo por progesterona con una palpación positiva (1.93%), es factible atribuirlo a un error en la identificación de las muestras y/o muestreo al momento de la extracción, dosaje o lectura (Cuadro 2). Los resultados del diagnóstico de gestación fueron erráticos para muestras de leche que tenían grumos y ésta pudo ser otra causante (8) en el porcentaje de error que se obtuvo en este trabajo.

En los animales que habían resultado positivos con la progesterona y que no fueron confirmados a la

palpación, la falta se atribuyó a la presencia de mortalidad embrionaria, que con muy escasa variación fluctuó alrededor del 13%.

Estas cifras son ligeramente superiores a las reportadas para animales mestizos de 8% (7) y 7% (27). Otros autores reportaron valores diversos de mortalidad embrionaria, fluctuando entre 12% (4,23) y 17% (14, 28).

Estos resultados justifican la selección de la concentración de 0.50 ng/ml para diferenciar animales gestantes de no gestantes al ofrecer una eficiencia total para el diagnóstico de 85.02% (176/207), superior a lo obtenido para concentraciones de 0.40 y 0.55 ng/ml (82.1% y de 0.60 ng/ml 81.6%) (Cuadro 1).

2. Día post-servicio más adecuado para la muestra diagnóstica

Se aprecia que indistintamente de la concentración de progesterona utilizada, fueron los días 20 al 23 post servicio los que ofrecieron una mayor constancia de efectividad en

Cuadro 2. Efectividad total del diagnóstico de gestación y no gestación al relacionar los resultados de la determinación de progesterona con la palpación rectal en vacas mestizas.

Grupos	No.	Efectividad (%)	Coincidencia (% relativo)	No Coincidencia (%)
Grupo 1 Pg (-) PR (-)	75		48.80	
Grupo 3 Pg (-) PR (+)	4		1.93	
	79	94.90	50.73	5.10
Grupo 2 Pg (+) PR (+)	101		48.80	
Grupo 4 Pg (+) PR (-)	27		13.00	
	128	78.90	61.80	21.10
	207		85.00	

los resultados, confirmando resultados previos (12). Algunos autores reportaron una similar variación entre el porcentaje de efectividad del diagnóstico de gestación y no gestación tomando en cuenta los niveles de progesterona en leche entera y descremada confirmados a la palpación rectal (5, 14, 21, 24).

No se detectó una dependencia significativa entre el día del muestreo (19 al 24 post servicio) en relación con los niveles de progesterona.

Al comparar la determinación de progesterona con la palpación rectal, en distintos momentos después del servicio, se corroboran estos resultados tanto para el diagnóstico de gestación como de no gestación (Cuadro 3); no obstante, con una efectividad media de 85%, es fácil presumir una mayor utilidad al aplicar la técnica de RIA para la determinación de progesterona en el diagnóstico precoz de no gestación, indistintamente del día de muestreo, aunque los días más efectivos fueron los días 20-23

Cuadro 3. Eficiencia de la prueba diagnóstica de gestación y no gestación utilizando la determinación de progesterona (0.5 ng/ml) comparada con la palpación rectal en vacas mestizas, de acuerdo al día del diagnóstico post-servicio.

Días post-servicio	Eficiencia del diagnóstico					Efectividad	
	Gestación		No Gestación			Total	
	n	No.	%	No.	%	No.	%
19	8	2	50.0	4	100.0	6	75.0
20	23	11	78.6	9	100.0	20	86.9
21	24	11	84.6	10	90.9	21	87.5
22	123	64	79.0	40	95.2	104	84.5
23	17	7	89.0	8	88.0	15	88.0
24	12	6	75.0	4	100.0	10	83.0
Total	207	101	79.0*	75	94.9 *	176	85.0

* $P < 0.05$

post servicio, confirmando reportes de otros autores (5, 9, 18, 19).

La efectividad del diagnóstico de gestación por la determinación de los niveles de progesterona confirmada por la palpación rectal revela en los grupos 1 y 2 una concordancia altamente positiva para el diagnóstico de no gestación, 94.9% contra 78.9% del diagnóstico de gestación positivo ($P < 0.01$) (Cuadro 2). Porcentaje similar ha sido reportado por otros autores (5, 18).

3. Influencia del tipo racial, época de servicio y número de partos.

El tipo racial no tiene influencia sobre la efectividad del diagnóstico de gestación, ni sobre los niveles de progesterona en leche descremada. Por el contrario, se ha reportado que la concentración de progesterona en leche completa es afectada por

la raza, al encontrar una mayor concentración de progesterona en la Jersey que en la Pardo Suizo, Ayrshire o Holstein (18). Similarmente se han señalado resultados diferentes en las concentraciones de progesterona referidos a los animales Jersey y Danish, encontrándose valores mayores de progesterona para el diagnóstico de gestación en los Jersey, a la vez que el porcentaje de efectividad es mayor para estos animales (21). No se han reportado variaciones de acuerdo al tipo racial en animales mestizos con predominio europeo o cebuino. Tampoco existe relación entre los niveles de progesterona y el diagnóstico de gestación con respecto a la época del servicio al animal.

En vacas mestizas no se han descrito los efectos de la época del servicio sobre el diagnóstico de gestación ni sobre los niveles de progesterona.

terona. No obstante, se ha reportado que los resultados del diagnóstico no fueron afectados por la época de servicio en vacas lecheras (13).

No se observó dependencia del número de partos de la vaca sobre la efectividad con respecto a los niveles de progesterona ($P < 0.05$). Es posible destacar que las vacas de tres y cuatro o más partos muestran cierta tendencia para una mayor efectividad del diagnóstico. En vacas mestizas no se ha reportado el efecto del número de partos sobre la efectividad del diagnóstico de gestación.

Al aplicar el análisis de varianza para observar los efectos de las variables época de servicio, tipo racial, número de partos y lapso entre

el servicio y la muestra, sobre la efectividad del diagnóstico de gestación, se observó que no existe ningún efecto de estas variables sobre el diagnóstico de gestación (Cuadro 4).

El análisis de varianza para detectar los efectos de las variables época del servicio, tipo racial, número de partos, diagnóstico de gestación, palpación y el lapso entre el servicio y la muestra sobre los niveles de progesterona mostró igualmente que sólo fueron significativos los efectos de la época de servicio, número de partos y diagnóstico de gestación ($P < 0.05$); las interacciones entre las otras variables no fueron significativas (Cuadro 5).

Cuadro 4. Análisis de varianza. Variable dependiente: gestación.

Fuente de Variación	G.L	S.C	C.M.	F
Epoca	2	0.6856	0.3428	1.53 ns
Raza	2	0.1476	0.0730	0.33 ns
Nº de Partos	3	1.1534	0.3844	1.71 ns
INTSM	5	0.9478	0.1895	0.84 ns
Epoca x Raza	4	1.2868	0.3210	1.43 ns
Epoca x Parto	6	2.0579	0.3429	1.53 ns
Epoca x INTSM	9	1.5908	0.1767	0.79
Raza x INTSM	10	2.4282	0.2428	1.08 ns
Parto x INTSM	13	3.3523	0.2578	1.15 ns
Raza x Parto	6	2.4250	0.4041	1.80 ns
Modelo: Niveles Progesterona	60	16.0758		
Error	146	32.7740		1.19 ns
Total	206	48.8502		

$r = 32.91\%$ $CV = 29.27\%$

INTSM = Intervalo servicio - Día de muestra

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos

Cuadro 5. Análisis de varianza. Variable dependiente: Niveles de progesterona.

Fuente de variación	G.L.	S.C.	C.M.	F
Efecto época	2	17.6750	8.8370	9.73 **
Efecto raza	2	2.5774	1.2880	1.42 ns
Efecto No. de partos	3	18.1140	6.0380	6.65**
Efecto INTSM	5	8.7888	1.7577	1.94 ns
Interacción raza x INTSM	10	9.4026	0.9402	1.04 ns
Interacción época x raza	4	0.7225	0.1806	0.20 ns
Interacción época x parto	6	7.9960	1.3326	1.47 ns
Interacción palpación x época	2	0.1624	0.0812	0.09 ns
Interacción época x INTSM	9	4.4299	0.4922	0.54 ns
Modelo: Niveles Progesterona	58	595.1510		
Error	148	134.3650		11.30 **
Total	206	729.5160		

** P < 0.01 r = 81.58% CV = 31.26 %

INTSM = Intervalo servicio - Día de muestra

Conclusiones

La concentración óptima de progesterona en leche descremada igual o mayor a 0.50 ng/ml determina el diagnóstico positivo de gestación y los valores menores de 0.50 ng/ml el estado de no gestación.

En los animales gestantes y no gestantes, los niveles promedio de progesterona en leche descremada fueron de 2.3 ± 1.9 y 0.29 ± 0.04 ng/ml entre los días 19 y 24 post servicio.

Los días 20 al 23 presentaron el mayor porcentaje de éxito en el diag-

nóstico, siendo la eficiencia total de 85.0% al comparar la progesterona determinada per RIA con el examen clínico por palpación rectal. La efectividad del diagnóstico precoz de no gestación fue de 94.9%, significativamente superior al 79% hallado para el diagnóstico de gestación. Se señala un margen de error del diagnóstico de 1.93%, mientras que 13% de casos son atribuibles a mortalidad embrionaria.

Puede considerarse la determinación de progesterona en leche descremada mediante radioinmunoanálisis como un método de amplia utilidad práctica para el diagnóstico de gestación en la vaca, permitiendo

identificar precoz y rápidamente los animales no gestantes, de forma que pueda procederse a un nuevo servicio o a la corrección del problema de anestro post servicio.

Literatura citada

1. Bloomfield, A. G., S.V. Morant and M.J. Ducker. 1986. A survey of reproductive performance in dairy herds. Characteristics of the patterns of progesterone concentrations in milk. *Anim. Prod.* 42: 1-10.
2. Butterfield, W.A., M.C. Lyne and A.W. Lishman. 1988. Diagnosis of pregnancy in dairy cows based on the progesterone content of milk. Part I. Discriminating between pregnant and no pregnant levels. *South African J. Anim. Sc.* 18 : 150-152.
3. Cekan, S.Z. 1976. Reliability of steroid radioimmunoassay. *Acta Univ. Upsalien* 14, 1-148.
4. Freymark, P.J. and C.T. McCabe. 1986. Use of radioimmunoassay for quantitative determination of progesterone in milk samples from dairy cows in Zimbabwe. *Vienna, Austria.* 97-104.
5. González Stagnaro, C. 1985. Necesidades y aplicación de las técnicas de radioinmunoanálisis en el control y mejora de la eficiencia reproductiva en bovinos. Resultados experimentales en la determinación de progesterona sérica en vacas mestizas. *Universidad del Zulia. I Jornadas Científicas Veterinarias.* Julio, 1985. Maracaibo Venezuela. Mimeo. 16 pp.
6. González Stagnaro, C., J. M. Corteel, G. Barril and D. Andre. 1986. Diagnóstico precoz de gestación en la cabra lechera por determinación de los niveles de progesterona en plasma sanguíneo y leche. Taller: Avances de la aplicación de la técnica de radioinmunoanálisis en la producción animal. Maracaibo. Venezuela. Noviembre 1987, 32-44.
7. González Stagnaro, C., J. Goicochea, N. Madrid and D. Medina. 1992. Embryonic mortality in crossbred cows. 43rd Ann. Meet. European Ass for Anim. Prod. Madrid, Spain. III, 3. 15.
8. Heap, R.B., J. L. Linzell and J. A. Laing. 1974. Pregnancy diagnosis in cows. Use of progesterone concentration in milk. *Vet. Rec.* 94: 160-170.
9. Inaudi, P., M. Bacigalupo, C. Monittola, G. Lugaro and A.R. Genazzani. 1982. Pregnancy diagnosis in cattle by a rapid highly reliable method for progesterone determination in milk, *J. Reprod. Fert.* 65 : 265-268.
10. International atomic energy agency. 1984. Laboratory training Manual on radioimmunoassay in animal reproduction. Technical Reports Series No. 23. Vienna, Austria.
11. Koefoed-Johnsen, H. H. 1977. Practical experience of milk progesterone tests for pregnancy diagnosis in a random samples of Danish dairy herds. *Ins.: for Sterilitestforskning.* 20 : 75-79.
12. Krsmanovic, L., R. Kovacevic, S. Veselinovic, D. Maric, R. Perkucin and L. Mandic. 1986. Early diagnosis in cows by milk progesterone assay. *Vet. Glasnik (Yugoslavia).* 40 : 719-722.
13. Mabruk, H. S., D. L. Kreider, O.T. and Stallcup and J. M. Rakes. 1987. Milk progesterone as a monitor of pregnancy status in cattle. *Med. Sci. Res.* 15 : 503-504.
14. MacFarlane, J.S., J. M. Booth, D.W. Deas and B. G. Lowman. 1977. Pregnancy test and evaluation of embryonic and fetal mortality based on progesterone concentration in fore milk. *Vet. Rec.* 100 : 565-566.
15. Mc Gaughy, W. J. and O. Gordon. 1979. Milk progesterone assay. A comparison of interquarter and sampling time variation. *Br. Vet. J.* 135 : 512-516.

16. Morrison, D.F. 1976. *Multivariate Statistical Methods*. Mc Graw-Hill Kogakusha, Ltd Second edition. 230-239.
17. Oltner, R. and L.E. Edquist. 1981. Progesterone in defatted milk: its relation to insemination and pregnancy in normal cows as compared with cows on problem farms and individual problem animals. *Br. Vet. J.* 137: 78-87.
18. Pennington, J. A., L. H. Schultz and W. F. Hoffman. 1985. Comparison of pregnancy diagnosis by milk progesterone on day 21 and 24 postbreeding: Field study in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 68 : 2740-2745.
19. Pérez, García y F. Saiz Cidoncha. 1981. Diagnóstico precoz de gestación en la vaca. *Higia Pecoris*. III : 47-62.
20. Picha, J., M. Dvoracek, M. Pöschl, Z. Pilz and D. Pichova. 1977. Progesterone concentration in milk during oestrous cycle and after fertile insemination. *Zivocisna Vyroba*. (Czechoslovakia) 22 : 587-599.
21. Rainio, V. 1987. Whole milk progesterone analysis used for pregnancy diagnosis in beef cattle. *Acta Vet. Scan.* 28 : 249-250.
22. Ramírez, I.L. 1988. Factores que afectan el reinicio de la actividad post parto en vacas mestizas primíparas en el Trópico. Tesis Magíster. Post grado en Producción Animal. Universidad del Zulia. Maracaibo.
23. Reimers, T., R. Smith and Newman. 1985. Management factors affecting reproductive performance of dairy cows in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.* 68 : 963-972.
24. Robert, O. and R.T. Taylor. 1986. Reproductive status in four herds of Jersey cows tested for milk progesterone concentration. *Turrialba*. 36 : 179-186.
25. Rodbard, D. 1978. Quality control of RIA In: *Radioimmunoassay and related procedures in Medicine*. Vol II. Intern. Atomic Energy Agency, 21. Vienna
26. SAS User's Guide. 1979. Edition SAS Institute INC.
27. Shemesh, M., N. Azalon, E. Shalev, A. Nerya, H. Schindler and F. Milgaur. 1978. Milk progesterone measurement in dairy cows correlation with estrus and pregnancy determination. *Theorico-genology*. 9 : 343-352.
28. Wood, P.D.P. 1976. A note on detection of oestrus in cattle breed by artificial insemination and the measurement of embryonic mortality. *Anim. Prod.* 22 : 275-278.