

DETERMINACIÓN DE PROGESTERONA PLASMÁTICA POR EL MÉTODO DE ELISA EN RECEPTORAS DE EMBRIONES BOVINOS

Plasmatic progesterone determination by ELISA assay in bovine embryo recipient heifers

Noris Roa A.*
Tiburcio Linares*
Diego Barrios**
Morella Ramírez de Rolo***
Rita Tamasaukas****

* Instituto de Investigaciones Zootécnicas, CENIAP- FONAIAP

** Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV

*** Instituto de Investigaciones Veterinarias, CENIAP-FONAIAP
Maracay, Estado Aragua, Venezuela

****Universidad Rómulo Gallegos, LABIPRESAN

San Juan de Los Morros, Estado Guárico, Venezuela

RESUMEN

Se determinaron las concentraciones de progesterona (P4) plasmática por Enzímoinmunoanálisis (ELISA), de 47 novillas mestizas *Bos indicus* x *Bos taurus* receptoras de embriones bovinos, en un programa comercial de transferencia de embriones (TE) en el Estado Monagas, Venezuela, con la finalidad de tener diagnóstico precoz de preñez. La tasa de preñez se confirmó por palpación transrectal a los 60 días post TE. De las 47 transferencias, 18 receptoras (38.3%) resultaron preñadas y 29 (61.7%) vacías. La regresión lineal, el análisis de varianza (ANAVAR) y de Jí cuadrado, no demostraron ($P > 0.05$) diferencias significativas entre las concentraciones de P4 de receptoras preñadas y vacías para los días 0 (celo) y 7 (TE) del ciclo estral. Para el día 21, las concentraciones de P4 en preñadas, fueron más altas ($P < 0.05$) (12.2 ± 2.2 ng/ml) que en vacías (0.82 ± 0.42 ng/ml). En el día 21 post celo se obtuvo un 75% de efectividad en la detección de preñadas y un 100% en vacías utilizando las concentraciones de P4 (2 ng/ml de P4, como criterio discriminador). Se concluye que la determinación de las concentraciones de P4 entre los días 21 a 24 post celo da un alto porcentaje de seguridad en el diagnóstico precoz de hembras vacías, para reciclarlas antes de los 60 días post celo, disminuyendo así los costos de mantenimiento de las mismas.

Palabras clave: Progesterona, receptoras de embriones bovinos, ELISA, preñez.

ABSTRACT

Plasma Progesterone (P4) concentrations were determined by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) in 47 *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred recipient heifers in an commercial embryo Transfer (ET) program in Monagas state, Venezuela. Pregnancy status was confirmed by rectal palpation 60 days after estrus. Pregnancy rates were 38.3% (18/47) while a 61.7% remained open. Simple linear regression, one way analysis of variance (ANOVA) and chi-square analysis indicated that there were not significant differences ($P > 0.05$) between plasma P4 concentrations of females which remained pregnant and that of cows open on days either 0 (estrus) or 7 of the estrous cycle (ET). On day 21, concentration of P4 in pregnant females was 12.2 ± 2.2 ng/ml being significantly higher ($P < 0.05$) compared to non-pregnant females (0.82 ± 0.42 ng/ml). Recipients having plasma P4 concentration of 2 ng/ml or more on day 21, were considered as pregnant. The accuracy of this test for diagnosing pregnancy was 75% and 100% for open cows. In summary, evaluating the concentration of P4 on days 21 to 24 after estrus give a high percentage of safety in the early diagnosis of pregnancy and to recycle the open recipient before 60 days post estrus, reducing thus, the maintenance cost of them.

Keywords: Progesterone, bovine embryos recipients, ELISA, pregnancy.

INTRODUCCIÓN

En fincas donde actualmente se usan técnicas reproductivas biotecnológicas como el trasplante embrionario en forma comercial, se presentan fluctuaciones en las tasas de preñez de las hembras receptoras de embriones, lo cual podría ser causa de pérdidas económicas en dichas unidades de producción [3]. En consecuencia, la rentabilidad económica de cualquier empresa pecuaria que use trasplante embrionario depende en alto grado de la tasa de preñez y de un adecuado reciclaje de las receptoras.

Muchos estudios se han encaminado a investigar los niveles hormonales y/o la actividad ovárica en las hembras receptoras de embriones para tratar de explicar las causas de una respuesta inadecuada al establecimiento de la preñez post-trasplante. En ganado bovino, el método de diagnóstico de preñez más difundido depende del no retorno del celo y su subsecuente confirmación por vía de palpación transrectal [33]. Sin embargo, medir concentraciones de P4 en sangre o leche los 20 a 24 días post servicio puede ser usado como un indicador de diagnóstico de preñez a vacas.

Una forma de determinar el perfil hormonal de la hembra bovina durante el ciclo estral, es a través de la técnica de Enzimo-inmunoanálisis (ELISA) [11,12,13,15,17,20,21,27], la cual indica con exactitud si la hembra está ciclando normalmente o si existen fallas en la detección del celo. La técnica de ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático de tipo heterogéneo, cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa Enzyme linked immuno sorbent assay [1,2,5,24,26,32,35,38,40,43]. En él se emplea un soporte al cual se fija uno de los componentes de la reacción inmunológica, con el fin de investigar posteriormente el comportamiento en una muestra dada [7,40,43]. Dicha técnica complementaría con exactitud el diagnóstico de la función y desarrollo del cuerpo lúteo, que se realiza por palpación transrectal, al momento de la transferencia embrionaria.

La prueba recurre al empleo de inmunógenos, haptenos o anticuerpos marcados con una enzima, para revelar el reactivo complementario a nivel de distintos fluidos biológicos; revela y cuantifica diversos tipos de sustancias presentes en líquidos orgánicos; antígenos, anticuerpos, hormonas, fármacos, etc. [14,42]. Actualmente se ha expandido su uso en endocrinología para la cuantificación de hormonas en inmunología para la medición de inmunoglobulinas e inmunocomplejos, y en microbiología para la identificación y cuantificación de antígenos y/o anticuerpos en infecciones bacterianas, micóticas, parasitarias o virales [6,18,43].

Con el propósito de obtener un diagnóstico precoz de preñez post TE y lograr algunas respuestas a la interpretación de los problemas reproductivos, conducentes a bajas tasas de preñez, se diseñó este ensayo donde se determinan las concentraciones de P4 plasmática, utilizando la técnica de ELISA, como una buena herramienta predictora de la preñez y que

complementaría el diagnóstico de calidad y desarrollo del cuerpo amarillo realizado por palpación transrectal el día 7 del ciclo estral (CE) para determinar la posible viabilidad de preñez que puedan presentar estas receptoras post TE.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

La presente investigación se realizó en una explotación bovina ubicada en el Municipio San Simón del Estado Monagas, Venezuela. Caracterizada por ser una zona de Sabanas bien drenada, con altitud 350 m.s.n.m., latitud norte 9° 33' 10" y longitud oeste 63° 19' 40".

Clima

El clima en esta finca corresponde a sabanas estacionales e hipertérmicas, con precipitación promedio de 1350 mm, temperatura promedio anual de 26.4°C, con 7 meses de período seco (Noviembre a Mayo) y 5 meses de período lluvioso (Junio a Octubre).

Época de Estudio

Los muestreos sanguíneos se realizaron en el período que tradicionalmente es el lluvioso, correspondiente a los meses de julio a octubre. La oferta de forraje en cantidad y calidad estuvo asociada al ciclo de lluvias, cambios de temperatura y vientos.

Animales Experimentales

El estudio incluyó un total de 47 novillas mestizas *Bos indicus* x *Bos taurus* receptoras de embriones bovinos de 2 a 2 ½ años de edad con condición corporal óptima de 5 y 6, en base a la escala del 1 al 9 de ganado de carne [22] y con una historia reproductiva cíclica regular, la observación del celo fue con el método AM - PM (30 min. de observación en la mañana y 30 min. en la tarde). La alimentación usada en la finca fue la tradicional, es decir, pastoreo rotativo de potreros con pastos del género *Brachiaria sp.* y con consumo de sales minerales *ad libitum*.

Material Específico para ELISA

Los materiales usados fueron kits diagnósticos para determinar P4 en plasma sanguíneo de uso comercial por el método de ELISA (Ovasure, de Cambridge Life Science Co., Ltd. U.K), que contiene los siguientes reactivos: conjugado (P4 marcada con fosfatasa alcalina, 25 ml); tabletas de sustrato (fosfato de p-nitrofenil, 3 tabl. x 40 mg); buffer sustrato (dieta-nolamina 1.0 M, 25 ml), solución frenadora (fosfato 0.5 M, 20 ml); Standard de P4 (0.5; 1.0; 5.0; y 10.0 ng/ml; 1 ml de cada uno); microplaca de ELISA con 96 agujeros conteniendo el anticuerpo de P4 y rejilla cargadora de microplacas. Se usó un

TABLA I

**CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA
PROMEDIO EN RECEPTORAS DE EMBRIONES BOVINOS**
(ng/ml, \pm DE)

Día del Muestreo	0 (Celo)	7 (TE)	21
Preñadas*	0.85 (\pm 0.52)	5.75 (\pm 1.82)	12.16 (\pm 2.18)
Vacías con TE*	1.4 (\pm 1.93)	6.2 (\pm 3.26)	0.82 (\pm 0.42)

TE= Transplante de Embriones. \pm DE= \pm Desviación Estándar.

* = ng/ml; \pm DE.

lector de placas de ELISA Multiskan Plus versión 1.4, ajustado el espectrofotómetro para leer absorbancia a 405 nm.

Recolección de las Muestras de Sangre

Se colectaron 8 ml de sangre de las venas coccígeas en tubos vacutainer con EDTA potásica el día del celo (día 0), el día de la transferencia de embriones (día 7) y el día 21, del ciclo a cada una de las 47 receptoras seleccionadas, previa identificación de los tubos colectores de sangre. Las muestras fueron centrifugadas inmediatamente después de la colección, para evitar su metabolización, por 15 minutos a 3000 rpm en una centrífuga portátil (Fisher Scientific, modelo 228), y se transegó el plasma obtenido a los viales plásticos identificados para congelarlos a -20°C (congelador Gibson Heavy Duty Commercial), hasta su procesamiento en el laboratorio [28,41]. Se uniformizaron todos los factores que pudieran influir en el muestreo, haciéndolo a una misma hora en la mañana (6:30 a.m.) de los días del muestreo, manteniendo el mismo patrón de recolección, centrifugación, congelación y almacenamiento.

Confirmación de Preñez

La confirmación de preñez se realizó, vía palpación transrectal, 60 días post-transplante.

Técnica de ELISA para P4

La cuantificación hormonal se realizó utilizando el método descrito por Cambridge Veterinary Sciences L.T.D. en 1993, Kubiak [15] y Munro [21], con kits de uso comercial. Previa a la realización del análisis de las muestras en el laboratorio, se procedió a hacer unas pruebas de validación del kit a usar para tener un control de calidad del mismo, las cuales fueron: para especificidad, la prueba de paralelismo y para precisión, el cálculo del coeficiente de variación (CV) intra e interensayo. La evaluación realizada al Kit utilizado señaló que tiene paralelismo. El CV intraensayo calculado fue de 5,77% y el CV interensayo fue de 6,50% valores que están dentro de los rangos óptimos de CV para ambas pruebas .

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos realizados fueron: correlación, para determinar el grado de asociación existente entre las diferentes concentraciones de P4 en los diferentes días de muestreo; el análisis de regresión lineal, para verificar el grado de predicción de los valores el día 7 del ciclo estral con las concentraciones de P4 de los diferentes días del muestreo; el análisis de varianza (ANAVAR), para determinar diferencias significativas de concentraciones de P4 entre el grupo de receptoras preñadas y vacías para los diferentes días del muestreo, y la prueba de comparación de medias (TUKEY); los análisis estadísticos para precisión de los ensayos fue por el calculo de los coeficientes de variación intra e interensayo, utilizando el método descrito por Díaz [4] y Silvan [34]. Los análisis estadísticos fueron realizados siguiendo los procedimientos descritos por Steel y Torrie [37].

RESULTADOS

Las concentraciones de P4 en los días del muestreo sanguíneo mostraron los siguientes datos de un total de 47 receptoras de embriones utilizadas en este ensayo: 18 de ellas (38.3%) resultaron preñadas y 29 receptoras (61.7%) resultaron vacías. Las concentraciones de P4 plasmática promedio para los grupos de receptoras del ensayo durante cada uno de los días del muestreo, se muestran en la TABLA I.

En general, el patrón cíclico de las concentraciones de P4 detectado en este ensayo, concuerda con los cambios que ocurren durante el ciclo estral (CE) debido a la funcionalidad del cuerpo luteo (CL), tanto para receptoras preñadas como vacías. Asimismo, los resultados de este y otros trabajos, pueden explicar la función luteal por medio de la cuantificación de P4 plasmática sanguínea a nivel periférico durante estos días del muestreo [3, 8,9,10,16,19,23,29,31,36].

Las concentraciones de P4 presentaron una variación cuantitativa en función de la etapa del ciclo estral y del estado fisiológico (vacía o preñada) que presentó la hembra receptora al día del muestreo sanguíneo. Para el día 0 (celo), en las receptoras que quedaron vacías post TE, se observó un valor de 1.4 ng/ml en promedio, lo que indicó actividad luteal en ese día, esto fue debido a que una receptora presentó valores mayores de 0.5 ng/ml para ese día; sin embargo, el ANAVAR no demostró significancia entre las concentraciones de P4 de estas receptoras para ese día, TABLA I.

Otras variaciones observadas individualmente en las concentraciones de P4 con respecto a la longitud del CE en receptoras que quedaron vacías post TE, pueden ser debido a fluctuaciones individuales diarias de estas concentraciones, por la condición metabólica y nutricional presentada por cada animal al momento del muestreo sanguíneo. Esto sería mucho más fácil de demostrar cuando se toman muestras sanguíneas a intervalos más cortos. También los CE largos se atribuyeron

a mortalidad embrionaria que pudo haber ocurrido post TE y alargar la aparición del próximo celo post TE. Otros factores que pueden afectar el patrón cíclico de la P4 son la asincronía por errores de detección del celo, celos sin ovulación, regresión prematura del CL el día del trasplante embrionario, tal como lo señalan Chagas [3], Markette [19], Pope [25], Reed [30], y Stubbing y Walton [39].

La regresión lineal, y ANAVAR realizados para comparar diferencias entre las concentraciones de P4 en los diferentes días del muestreo y entre los diferentes grupos de receptoras (preñadas y vacías con TE), no demostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los dos (2) grupos para los días 0 (celo) y el día 7 (TE) del CE, TABLA II, por lo que se concluye que las concentraciones de P4 los días 0 (celo) y 7 (TE) del CE, no constituyen por sí solas, un indicio seguro para la selección de receptoras durante estos días, pero sí ayuda a no descartar potenciales receptoras de embriones que tienen concentraciones adecuadas de P4 y que a la palpación transrectal poseían CL pequeños.

En relación al diagnóstico precoz de preñez en receptoras de embriones bovinos se observó que a partir del día 21 post celo, comienzan a existir diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las concentraciones de P4 de los dos (2) grupos de receptoras preñadas y vacías. En las receptoras preñadas, la media de P4 se mantiene alta, en comparación con las receptoras vacías con TE cuyos valores bajan significativamente dando inicio a un nuevo CE y entre sus medias no hay diferencias significativas, TABLA III, lo que nos da una herramienta para determinar cuales receptoras post TE están vacías a los 21 días post celo y así proceder inmediatamente a reciclarlas para un nuevo programa de TE sin esperar el diagnóstico por palpación transrectal a los 45 ó 60 post celo.

Este tipo de diagnóstico de laboratorio (P4), tuvo una efectividad de 75% en detectar receptoras preñadas y de 100% en detectar las vacías correctamente para el día 21 post celo, teniendo como criterio de discriminación 2 ng/ml de P4 en plasma [8]. Hasler [8] señala que al utilizar la técnica de ELISA para la determinación de P4, a diferencia con la técnica de Radioinmunoensayo (RIA), los valores de ELISA pueden tener un valor no tan exacto como el determinado por el RIA, de allí que recomienda tomar el valor de 2 ng/ml de P4 como discriminatorio para este caso. Las hembras receptoras de embriones que presentaron valores mayores a 2 ng/ml en plasma se consideraron preñadas el día 21 y valores menores o igual a 2 ng/ml se consideraron vacías.

De las 29 receptoras diagnosticadas vacías 45 - 60 días post celo a la palpación transrectal, sólo 6 de ellas fueron diagnosticadas incorrectamente como preñadas por tener valores $>$ de 2 ng/ml el día 21 post celo, es decir, 20% de ellas. Este margen de error se debió a que estas receptoras presentaron ciclos estrales largos. Las posibles causas de estos ciclos largos fueron debido a preñeces que no llegaron a los 60 días, o a la presencia de alguna disfunción uterina resultante de conta-

TABLA II

CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA EN RECEPTORAS DE EMBRIONES BOVINOS LOS DÍAS 0 Y 7 DEL CE (ng/ml)

	Día 0 (Celo)	Día 7 (TE)
Receptoras Preñadas	0.85 ± 0.52 ns	5.75 ± 1.82 ns
Vacías	1.40 ± 1.93 ns	6.20 ± 3.26 ns

TE= Trasplante Embriones. n.s.= No significativo ($P > 0.05$).

TABLA III

CONCENTRACIONES DE PROGESTERONA PLASMÁTICA EN RECEPTORAS DE EMBRIONES BOVINOS EL DÍA 21 POST CELO

Hembras Receptoras	Preñada con TE	Vacía con TE
P4 (ng/ml)	12.16 ± 2.18 ^a	0.82 ± 0.42 ^b

TE= Trasplante de Embriones. a, b = Diferentes letras hay significancia $P < 0.05$.

minación con organismos patógenos al momento del trasplante y en general a mortalidad embrionaria.

CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

El presente trabajo presenta información básica aplicada que permite entender los eventos reproductivos principales que ocurren en las hembras receptoras de embriones bovinos, post TE, explotadas en una zona de sabanas estacionales bien drenadas al Oriente de Venezuela. La cuantificación de P4 en plasma sanguíneo permitió describir los valores de esta hormona en hembras receptoras de embriones bovinos post TE, tanto preñadas como vacías, el cual es semejante a lo reportado por la literatura.

A partir del día 21 post celo, se puede hacer un diagnóstico precoz de gestación con la técnica de ELISA, tomando en cuenta concentraciones de P4 plasmática, desde el día 21 post celo hasta el día 24, lo que permitiría incluir en el diagnóstico, receptoras que realmente no están preñadas pero que presentan ciclos largos (22-24 días).

Las receptoras diagnosticadas vacías el día 21 post celo, pudieron haber sido utilizadas de nuevo como receptoras (reciclaje rápido), sin tener que esperar la confirmación del diagnóstico transrectal tradicionalmente usado en la finca, sesenta días post celo, lo que pudo representar un ahorro en los costos de mantenimiento de las mismas equivalente a treinta días.

Los resultados de este estudio indican que entre los días 21-24 post celo y post TE, se puede determinar con una mues-

tra, las concentraciones de P4 plasmática a nivel de campo por la técnica de ELISA, para obtener un diagnóstico precoz de gestación y animales vacíos, y proceder a un reciclaje de receptoras más rápido y eficiente, sin esperar a confirmar el diagnóstico por palpación transrectal sesenta días post celo. Esto coincide con lo reportado en la literatura.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Avrameas, S. Heterogeneous enzyme immunoassays. In: Immunoassays for the 80s. A. Voller, A. Bartlett and D. Bidwell (Eds.). England: 85-89. 1981.
- [2] Bracho, D.I. Manual de Inmunodiagnóstico. Fundamentos. Aplicaciones. (Trabajo de ascenso). Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. Universidad del Zulia: 7-27. 1985.
- [3] Chagas e Silva, J.N.; Cidadao, M.R. y Costa, J.A. Selección de vacas frías para receptoras de embriones frescos e congelados com base na progesterona plasmática. Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias. Vol. LXXXVIII. Nº 508: 156 - 163. 1993.
- [4] Diaz, T. Desarrollo del radioinmunoanálisis para la determinación de progesterona en plasma de yegua, cerda y oveja. (Trabajo de ascenso). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela: 1-63 1991.
- [5] Dinter, Z. Diagnostic Virology. A review of methods at The National Veterinary Institute. Uppsala Sweden. Coordinated Research Programme on Animal Disease Diagnostics. Ed. J. Moreno López: 1 - 48. 1989.
- [6] Engvall, E. History and future outlook of enzyme immunoassay. In: Ishikawa, e.; Kawai, t.; Miyai, k. (Eds). Enzyme Immunoassay. Tokyo: Igaku-Shoin Ltd: 1 - 3. 1981.
- [7] Harlow, E. y Lane, D. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory U.S.A.: 553-612. 1988.
- [8] Hasler, J.F.; Bowen, R.A.; Nelson, L.D. and Seidel, G.E. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. J. Reprod. Fertil. 58: 71 - 77. 1980.
- [9] Hasler, J.F.; McCauley, A.D.; Lathrop, W.F. and R.H. Foote. Effect of Donor-Recipient Interactions on Pregnancy rate in a large Scale Bovine Embryo Transfer Program. Theriogenology. Vol. 27: 139 - 168. 1987.
- [10] Hussein, F.M.; Paccamonti, D.L.; Eilts, B.E. and Younis, M.Y. Comparison of ovarian palpation, milk progesterone and plasma progesterone in the cow. Theriogenology. 38: 431- 439. 1992.
- [11] Jainudeen, M.R. and Hafez, S.A. Pregnancy diagnosis. In: Reproduction in Farm Animals. Ed. E.S.E. Hafez. 5th. Ed. Lea and Febiger-Philadelphia: 517-527. 1987.
- [12] Kamonpatana, M.; Van de Wiel, D.F.M.; Koops, W.; Leananuruksa, D.; Ngramsuriyaroy, C. and Usanakernkul, S. Oestrus control and early pregnancy diagnosis in the swamp buffalo. Comparison of enzyme immunoassay and radioimmunoassay for plasma progesterone. Theriogenology 11: 399-406. 1979.
- [13] Keeling, B.; Rajamahendran, R. and Ravindran, V. Detection of postpartum ovarian activity in cows using on farm progesterone ELISA. Vet. Rec. 131: 291-293. 1992.
- [14] Kemeny, D.M. Titration of antibodies. J. of Immunological Methods. 150: 57 - 76. 1992.
- [15] Kubiak, J. Application of enzyme immunoassay (RIA) to the study of hormones, with particular reference to the determination of progesterone. Research Technique Report. In partial fulfillment of the requirements for: ANSC 631. Physiology of Reproduction: 1-6, 1986.
- [16] Linares, T.; Larsson, K. and Edqvist, E. Plasma progesterone levels from oestrus through day 7 after A.I. In Heifers carrying Embryos with normal or deviating morphology. Theriogenology 17 (2): 125 - 132. 1982.
- [17] Lopate, C. and Threlfall, W.R. Assessment of luteal function with progesterone enzyme immunoassays in the Horse mare. Theriogenology. 35 (3): 583 - 590. 1991.
- [18] Marcus, G.J. and Hackett, A.J. Use of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of bovine serum and milk progesterone without extraction. J. Dairy Sci. 69: 818 -824. 1986.
- [19] Markette, K.L.; Seidel, G.E. Jr. and Elsdén, R.P. Estimation of embryonic losses in bovine embryo transfer recipients from progesterone profiles and returns to estrus. Theriogenology 23 (1): 45 - 62. 1985.
- [20] Matsas, D.J.; Nebel, R.L. and Pelzer, K.D. Evaluation of an on-farm blood progesterone test for predicting the day of parturition in cattle. Theriogenology. 37: 859 - 868. 1992.
- [21] Munro, C. and G. Stabenfeldt. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for determination of progesterone. J. Endocr. 101: 41 - 49. 1984.
- [22] Nicholson, M.J. and Butterworth, M.H. A guide to condition scoring of Zebu cattle. International Livestock Centre for Africa Rev. Nº 8: 14 - 22. 1986.
- [23] Ott, R.S.; Bretzlaff, K.N. and Hixon, J.E. Comparison of palpable corpora lutea with serum progesterone concentrations in cows. Jour. Am. Vet. Med. Assoc. Vol. 188 (12): 1417 - 1419. 1986.
- [24] Pesce, A.J. and Michael, J.G. Artifacts and limitations of enzyme immunoassay. Journal of Immunological Methods. 150: 111 - 119. 1992.

- [25] Pope, G.S.; Gupta, S.K. and Munro, I.B. Progesterone levels in the systemic plasma of pregnant, cycling and ovariectomized cows. *J. Reprod. Fert.* 20: 369 -381. 1969.
- [26] Porstmann, T. and Kiessig, S.T. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *Journal of Immunological Methods.* 150: 5 - 21. 1992.
- [27] Prakash, B.S.; Madan, M.L.; Jaikhani, S. and Singla, S.K. Development of a simple, direct, microtitreplate enzyme-immunoassay (EIA) for progesterone determination in whole milk of buffaloes. *Br. Vet. J.* 146: 571 - 576. 1990.
- [28] Pulido, A.; Zarco, L., Galina, C.S.; Murcia, C.; Flores, G. and Posadas, E. Progesterone metabolism during storage of blood samples from Gyr cattle: Effects of anticoagulant, time and temperature of incubation. *Theriogenology* 35: 965 -975. 1991.
- [29] Randall, G.C.B.; Betteridge, K.J.; Eaglesome, M.D. and Sugden, E.A. Progesterone and Prostaglandin F-Metabolite levels in the peripheral blood of cattle used as recipients 16 or 17 days after estrus. *Theriogenology* 13 (1): 108. 1980.
- [30] Reed, M.L.; Roussel, J.D. and Seybt, S.H. Repeatability of blood serum progesterone levels in dairy heifers on day 7 of the estrous cycle. *Theriogenology.* Vol. 24: 634 - 646. 1985.
- [31] Remsen, L.G. and Roussel, J.D. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology.* Vol. 18: 365 - 372. 1982.
- [32] Rockborn, G.; Klingeborn, B. and Junti, N. Diagnostic virology. Coordinated research programme on animal disease diagnostics. (Manual) Ed. J. Moreno López: 1 - 19. 1990.
- [33] Sasser, R.G. and Ruder, C.A. Detection of early pregnancy in domestic ruminants. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 34: 261- 271. 1987.
- [34] Silvan, G.; Illera, J.C.; Illera, M.J. and Illera, M. Development and validation of competitive ELISA to measure steroid follicular fluid levels in heifers. *Theriogenology.* 37 (1): 298. 1992.
- [35] Snoijink, J.J. Selection of ELISA reagents. (Letter to the editors). *Journal of Immunological Methods.* 96: 283 -285. 1987.
- [36] Stabenfeldt, G.H.; Edqvist, L.E.; Kindahl, H.; Gustafsson, B. and Bane, A. A practical implication of recent physiological findings for reproductive efficiency in cows, mares, sows and ewes. *J.A.V.M.A.* 172: 667 - 675. 1978.
- [37] Steel, R.G.D. y Torrie, J.H. *Bioestadística: Principios y procedimientos.* McGraw Hill. 2da. ed. México: 1-622. 1988.
- [38] Stites, D.P. Métodos clínicos de laboratorio para la detección de antígenos y anticuerpos. En: *Inmunología básica y clínica.* Ed. El Manual Moderno S.A. de C.V. 4ta. edición. México : 334 - 374. 1983.
- [39] Stubbings, R.B. and Walton, J.S. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. *Theriogenology* 20 (2): 145 - 155. 1986.
- [40] Tizard, I. Serología: detección de anticuerpos y métodos de medida. En: *Inmunología Veterinaria.* Ed. Interamericana. McGraw-Hill. 3ra. Ed. México: 133 - 161. 1987.
- [41] Vahdat, F.; Hurtgen, J.P.; Whitmore, H.L., Johnston, S.D. and Ketelsen, C.L. Effect of time and temperature on bovine serum and plasma progesterone concentration. *Theriogenology* 12: 371 - 374. 1979.
- [42] Van de Wiel, D.F.M. and Koops, W. Development and validation of an enzyme immunoassay for progesterone in bovine milk or blood plasma. *Animal reproduction science.* 10: 201 - 213. 1986.
- [43] Yarzabal, L.; Petralanda, I. y Arango, M. La técnica de ELISA y sus aplicaciones en inmunología Clínica. En: *Manual de Métodos en inmunodiagnóstico.* Fondo Editorial Acta Científica Venezolana: 197 - 213. 1985.