

**Diagnóstico temprano de preñez con prueba
Elisa en ganado lechero mediante el kit
IDEXX Bovine Pregnancy[®]**

**Walter Israel Gárate Zambrano
Wilson Joel Suarez Chavez**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA

**Diagnóstico temprano de preñez con prueba
Elisa en ganado lechero mediante el kit
IDEXX Bovine Pregnancy[®]**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieros Agrónomos en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por

**Walter Israel Gárate Zambrano
Wilson Joel Suarez Chavez**

Zamorano, Honduras
Noviembre 2015

Diagnóstico temprano de preñez con prueba Elisa en ganado lechero mediante el kit IDEXX Bovine Pregnancy®

Presentado por:

Walter Israel Gárate Zambrano
Wilson Joel Suarez Chavez

Aprobado:

Isidro A. Matamoros, Ph.D.
Asesor Principal

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Director Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

John Jairo Hincapié, Ph.D.
Asesor

Raúl H. Zelaya, Ph. D.
Decano Académico

Kenia David, Ing. Agr.
Asesora

Guillermo Zelaya Ing. Agr.
Asesor

Diagnóstico temprano de preñez con prueba Elisa en ganado lechero mediante el kit IDEXX Bovine Pregnancy®

**Walter Israel Gárate Zambrano
Wilson Joel Suarez Chavez**

Resumen. La reducción de días abiertos es uno de los principales objetivos en un hato con el fin de obtener buenos resultados reproductivos; para lograr esto se puede implementar una prueba de diagnóstico temprano de preñez, para identificar vacas vacías y tomar decisiones con aquellos que tengan problemas reproductivos. La prueba de detección temprana de preñez de IDEXX es una alternativa de diagnóstico a los 28 días post-inseminación. El estudio se realizó con el objetivo de determinar la sensibilidad del Kit de detección temprana de preñez IDDEX en bovinos. Se utilizaron 145 vacas de las razas Holstein, Jersey, Pardo Suizo y sus cruces. Se realizó detección temprana de preñez con una prueba ELISA a los 28 días pos inseminación artificial y para confirmar los resultados se realizó una palpación rectal a los 60 días con el fin de determinar muerte embrionaria, falsos positivos, falsos negativos, verdaderos positivos, sensibilidad y especificidad del kit. Se utilizó un diseño completo al azar con procedimiento de estadística descriptiva. No hay diferencias en porcentaje de preñez a los 28 días (47.6%) en comparación con el diagnóstico de palpación rectal a los 60 días (40.7%). Se obtuvo una sensibilidad de 82.6% y una especificidad de 97.4% con el uso del Kit IDEXX de diagnóstico temprano de preñez de gestación. Estos índices permiten la exitosa implementación de este kit de diagnóstico como una herramienta de manejo reproductivo ya que nos permite ahorrar tiempo en detectar vacas vacías.

Palabras clave: Días abiertos, falsos negativos, mortalidad embrionaria, verdaderos negativos, verdaderos positivos.

Abstract. Reducing days open is one of the main objectives in a herd in order to get good reproducible results; for this implementation to able to test early pregnancy, identify open cows and making decisions on those with reproductive problems. The screening test IDEXX pregnancy is an alternative diagnosis at 28 days post-insemination. The study was conducted to determine the sensitivity of the kit IDDEX early pregnancy detection in cattle. 145 cows of Holstein, Jersey, Brown Swiss breeds and their crosses were used. Early pregnancy detection was performed with an ELISA test 28 days after artificial insemination and to confirm results rectal palpation at 60 days was carried out to determine embryonic death, false positives, false negative, true positives, sensitivity and Kit specificity. A complete randomized design with descriptive statistical method was used. No differences in pregnancy rates at 28 days (47.6%) compared with the diagnosis of rectal palpation at 60 days (40.7%). A sensitivity of 82.6% and a specificity of 97.4% using the IDEXX kit early pregnancy diagnosis of pregnancy was obtained. These indices

allow the successful implementation of this diagnostic kit as a reproductive management tool allowing us to save time when detecting open cows.

Keywords: Open Days, false negatives, embryo mortality, true negative, true positives.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	v
Índice de cuadros, figuras y anexos.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES	10
5. RECOMENDACIONES	11
6. LITERATURA CITADA.....	12
7. ANEXOS	14

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Porcentaje de preñez con prueba ELISA y Palpación.	7
2. Porcentajes de reabsorción embrionaria.	7
3. Porcentajes de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos, sensibilidad y especificidad en el diagnóstico con prueba ELISA a los 28 días de gestación y palpación a los 60 días.	8
4. Tasa interna marginal de retorno de la implementación del Kit IDEXX.	9
Figuras	Página
1. Procedimiento del cálculo de porcentajes de sensibilidad y especificidad.	9
Anexos	Página
1. Muestra de sangre centrifugada por 3 min a 700 revoluciones para extraer el plasma donde se encuentra las enzimas asociadas a la preñez de la vaca.	14
2. Plasma sanguíneo extraído y colocados en tubos eppendorf para un mejor manejo de las muestras, ya sea para almacenamiento o realizar la prueba instantáneamente.	15
3. Detección de preñez a los 28 días con el Kit IDEXX Bovine Pregnancy®. Los pocillos de color azul son las vacas preñadas y los pocillos transparentes vacas vacías.	15

1. INTRODUCCION

Realizar un manejo adecuado en una finca da mejores resultados económicos y reproductivos que es el objetivo en una lechería. Para esto un productor debe apegarse al uso de tecnología que le permita utilizar métodos que ayuden a mejorar los índices de producción y obtener resultados deseados.

Para llevar a cabo el uso de tecnologías que permitan mejorar el rendimiento de un animal es importante utilizar métodos que proporcionen información confiable sobre el estado fisiológico de la misma, si está preñada o no, debido a que tiene un considerable valor económico, por esto es recomendable realizar un diagnóstico de preñez días después del servicio, con el fin de detectar presencia o ausencia de un feto, de tal manera que se pueda reducir tiempo perdido en producción o tomar decisiones con animales poco productivos en un hato. Adicionalmente, se obtiene datos de fertilidad sobre el toro utilizado o la eficiencia del técnico que realice la inseminación artificial. También se detecta problemas patológicos como quistes ováricos, infecciones uterinas entre otras que afectan la fertilidad (Robles 2014).

Unos de los problemas más comunes es el aborto; que es la expulsión de feto maduro incapaz de sobrevivir concluyendo con la preñez de manera prematura. Por otro lado, la muerte embrionaria, es la muerte que ocurre antes del reconocimiento materno de gestación (RMG). Hay dos tipos: la temprana, ocurre antes de los días 16 a 19 en donde los embriones que están retrasados de crecimiento no son capaces de establecer un mecanismo para evitar la regresión del cuerpo lúteo provocando su muerte; la tardía, esta tiene lugar después del reconocimiento materno de gestación (RMG), pero antes de que la organogénesis este completa, lo cual ocurre cerca del día 42 (Del Cura 2015).

La muerte embrionaria temprana representa entre un 70 a 80% de pérdidas totales de gestaciones en los animales y teóricamente no tiene ningún efecto sobre la duración del ciclo estral. La muerte embrionaria tardía representa un 10% de pérdidas en gestaciones pero provocan mayores daños económicos ya que es demasiado tarde para reincorporar al animal en un proceso de monta, son consideradas como “muerte fetales” (Diskin y Morris 2008).

La presencia de infecciones implica una disminución alrededor del 10% de preñez y el 50% de deficiencias reproductivas (Catena 2014). Esta se puede dar debido a una mala realización de inseminación artificial la cual puede lesionar el cérvix uterino o la alimentación con alto contenido de toxinas o estrógenos (Gélvez 2014). Efectos hereditarios o anormalidades cromosómicas presentadas en el toro o la vaca son

problemas genéticos que representan un 7% de pérdidas de la gestación, si no se maneja adecuadamente los estándares de confort del animal ya sea temperaturas bajas o elevadas puede causar pérdida de embriones. Por otro lado la sobrevivencia del embrión se puede ver afectada por una mal nutrición ya que puede coincidir en un balance energético negativo lo que resulta en una pérdida de condición corporal, riesgos para el anestro y prolongación de intervalo parto-concepción por lo que es recomendable proporcionar dietas altas en calorías (Del Cura 2015).

Para dar soluciones a estos problemas, existen varios métodos de diagnóstico de gestación, que tienen como objetivo identificar problemas presentes y determinar con el mayor porcentaje de efectividad la eliminación de falsos positivos o falsos negativos (Robles 2014). Uno de los métodos más tradicionales y económicos para hacer diagnósticos de preñez, es la palpación rectal, método físico que consiste en introducir la mano por el recto de la hembra para detectar sus órganos del aparato reproductivo para que nos brinde información de su estado fisiológico y diagnosticar preñeces mayores a los 60 días (Berrios 2014).

En la actualidad, otro método utilizado y más eficiente para realizar el diagnóstico de preñez, es el ultrasonido o ecógrafo. Al igual que la palpación rectal provee información al veterinario sobre el manejo reproductivo del hato. Con un diagnóstico de ultrasonido podemos realizar un examen entre el día 27 a 33 luego de la última inseminación dando resultados más seguros que una palpación rectal. Una de las grandes ventajas de la utilización de este método es que podemos confirmar casos de reabsorción embrionaria o abortos (Román 2014). En el diagnóstico con ultrasonografía la mayor ventaja es obtener un resultado predecible más confiable del animal no preñado, de esta manera se puede volver a sincronizar el celo en las vacas para luego ser inseminadas, reduciendo los días abiertos (Castellano Juarez y Matta Reyes 2014).

El uso de esta técnica en especies bovinas se da desde los años 80 y fue diseñado con el propósito de producir imágenes de los tejidos blandos y órganos internos. El principio básico de esta técnica consiste en una ecografía la cual emite ondas sonoras de alta frecuencia, su unidad de medida es el mega Hertz. Un MHz es equivalente a un millón de ondas sonoras por segundo las cuales no son audibles al oído humano (Tamayo 2007).

Como resultado de la implementación de esta técnica se forma una imagen de la estructura o tejido que se evalúa, esta imagen se observa a través de una pantalla en escalas de grises donde los colores más negros son líquidos, colores blancos son huesos y tejidos densos y colores grises para detectar cuerpo lúteo, estromas ováricos entre otros. Las frecuencias más comunes en este mecanismos van desde los 3.5 a los 7.5 MHz, para la detección de fetos se observa mejor con una frecuencia de 3.5 MHz (Perea 2006).

Al igual que la ultrasonografía, existe un nuevo método más rápido y muy poco utilizado. La prueba Elisa en bovinos es un enzimo-inmuno-ensayo que consiste en la detección precoz de glicoproteínas asociadas a la gestación (PAGs) y puede usarse en suero o plasma bovino (EDTA) a partir del día 28 post-inseminación con el objetivo de reducir el número de días abiertos.

Para realizar la prueba se extrae no menos de 2 ml de sangre del animal que se colocan en tubos de ensayo para centrifugar la muestra por 3 minutos aproximadamente, se retira el suero o plasma y se coloca en tubos *ependorf*. Las muestras deben mantenerse refrigeradas mientras se llevan al laboratorio para realizar la prueba (IDEXX, Diagnósticos Innovadores y Tecnologías 2015).

Con esta prueba se facilita la detección temprana de preñez, donde se acorta los intervalos entre partos confirmando gestación al día 28. Se incrementa la producción de leche por la reducción de los días abiertos, mejorando la eficiencia reproductiva y reduciendo los gastos por animales. Se puede eliminar los animales menos fértiles del rebaño y mejorar la salud ya que de la misma prueba se puede analizar el mal de Johne y el virus de la diarrea bovina (BVD).

Una vez que se centrifuga la sangre extraída de las vacas a las cuales se realiza el diagnóstico, el protocolo para llevar a cabo con la prueba y obtener los resultados para determinar preñez o vacas vacías, toma alrededor de 2,5 horas, lo cual hace que sea un método rápido y eficaz (IDEXX, Diagnósticos Innovadores y Tecnologías 2015).

De acuerdo a los conceptos anteriores, se realizó el presente estudio, teniendo como objetivo principal evaluar la sensibilidad del diagnóstico temprano de preñez con Prueba Elisa mediante el kit IDEXX Bovine Pregnancy® y como objetivos específicos determinar la sensibilidad del diagnóstico de preñez en hembras bovinas a los 28 días de la inseminación y determinar el porcentaje de falsos negativos, reabsorción embrionaria y abortos.

2. MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó entre mayo y agosto de 2015 en la Hacienda Santa Elisa dedicada a la producción de leche, en el municipio de Danlí, Departamento de El Paraíso, ubicada a 92 km al sudeste de Tegucigalpa, Honduras; con una temperatura promedio anual de 23.5 °C, una precipitación anual 1400 mm y una altura de 800 msnm.

Se utilizó 146 vacas, de las razas Holstein, Jersey y Pardo Suizo y sus cruces. Se utilizaron entre 30-35 vacas por cada muestreo durante los meses anteriormente mencionados.

Para realizar el estudio se utilizó jeringas de 10 mL para extraer la sangre de la vaca y colocarla en los tubos de ensayo de 10 mL, después la sangre es centrifugada por 3 minutos a 700 rpm para extraer el plasma sanguíneo. Luego este plasma es traspasado a tubos *ependorf* con el fin de dar un mejor manejo a la muestra para realizar el diagnóstico que se realizó con el Kit IDEXX Bovine Pregnancy[®] para determinar preñez.

Para el diagnóstico con la prueba Elisa las vacas fueron sometidas a un sangrado, en una manga de trabajo en corral para un mejor manejo, la muestra de sangre se extrajo de las venas de la región coccígea de la vaca. Cada muestra de sangre fue colocada en tubos de ensayos para ser centrifugadas. Luego de este procedimiento se obtuvo el plasma sanguíneo el cual contiene glicoproteínas asociadas a la gestación (PAGs) que fue traspasado en tubos *ependorf*. Una vez colocados en estos tubos se enfriaron hasta llegar al laboratorio y ser evaluadas con el Kit IDEXX Bovine Pregnancy[®] y detectar si la vaca está preñada o no.

El tiempo para realizar la prueba con el kit IDEXX siguiendo el protocolo es de 2.5 horas y una vez concluido se define con la ayuda de los controles negativo y positivos el estado de la vaca mediante la distinción del color que el pocillo obtuvo. Si el pocillo de la placa para realizar el test presentó un color transparente, la vaca se determinó vacía y los pocillos de color celeste tenue a azul indicando que la vaca está preñada.

Para llevar a cabo el diagnóstico con la prueba se siguió una serie de pasos:

Tanto las muestras (en el caso de haber sido refrigeradas) como los reactivos, tienen que adquirir temperatura ambiente y agitarse para homogenizar, además se preparó la solución de lavado con una relación 1/10 (10 mL de solución concentrada y 90 mL de agua destilada).

Luego se añadió una gota de diluyente en cada pocillo de la placa, se colocó con una pipeta los controles negativos y positivos, a continuación de los controles se aplicó con la pipeta graduada de 100 μ L una muestra de plasma sanguíneo de cada vaca sangrada, luego de colocar todas las muestras se tapó y golpeó suavemente para dejar reposar por 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación, se sacó el líquido de la placa y se lavó entre 3 a 5 veces sin permitir que se seque la placa.

A continuación se añadió dos gotas de la solución de detección en cada pocillo incluido los controles, se tapó y golpeó suavemente y se dejó reposar por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se sacó el líquido de la placa y se lavó entre 3 a 5 veces sin permitir que se seque la placa.

Luego se añadió dos gotas de conjugado de peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase, HRPO) en cada pocillo incluido los controles. Se tapó y golpeó suavemente y se dejó reposar por 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se sacó el líquido de la placa y se lavó entre 3 a 5 veces sin permitir que se seque la placa.

Después de haber agregado el conjugado, se colocó dos gotas de sustrato de tetrametilbenzidina (Tetramethylbenzidine, TMB) en cada pocillo. Se dejó incubar por 15 minutos. Al terminar con el tiempo se colocó la solución de frenado en cada pocillo. Por último, se validó los resultados de la prueba, para esto los controles negativos deben estar transparentes y los controles positivos color azul indicando preñez en la vaca.

A los 28 días pos inseminación artificial (IA) se realizó el diagnóstico con la prueba Elisa y a los 60 días la palpación rectal con el propósito de confirmar el diagnóstico de preñez realizado al inicio para determinar falsos negativos y reabsorción embrionaria.

Las variables que se analizaron fueron principalmente la sensibilidad y especificidad de implementar el Kit IDEXX Bovine Pregnancy[®], los porcentajes de preñez a los 28 días con prueba Elisa y preñez con palpación rectal a los 60 días, porcentajes de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos y reabsorción embrionaria.

Verdaderos positivos. Son aquellas vacas determinadas como preñadas en el diagnóstico con prueba Elisa a los 28 días y se confirmaron preñadas en el diagnóstico de palpación rectal a los 60 días.

Verdaderos negativos son las vacas que salieron vacías en la prueba realizada a los 28 días y reafirmando su estado a los 60 días en la palpación.

Falsos positivos. Son aquellas vacas que se diagnosticaron preñadas en el diagnóstico con la prueba Elisa a los 28 días y que con el diagnóstico de palpación rectal se diagnosticaron vacías.

Falsos negativos son las vacas diagnosticadas como vacías y a los 60 días con palpación se diagnostican preñadas. Verdaderos positivos y verdaderos negativos son considerados

como diagnósticos correctos y los falsos positivos y falsos negativos son considerados como diagnósticos incorrectos.

Sensibilidad: es la capacidad de la prueba para poder identificar correctamente aquellas vacas que están preñadas.

Especificidad: es la capacidad de la prueba para detectar correctamente las vacas vacías (Gutiérrez 2006).

Se utilizó un diseño completo al azar, en este experimento se usó diagnóstico de preñez mediante la prueba ELISA (28-40 pos IA) y palpación rectal a los 60 días. Para comparar los tratamientos con respecto a las diferentes técnicas de detección de la gestación. Se realizó un análisis de varianza para las variables numéricas y un análisis de Chi-cuadrado para las variables porcentuales, utilizando en ambos casos en sistema computarizado de Análisis estadístico (SAS 2013). El nivel de significancia exigido fue de $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Porcentajes de preñez, con prueba ELISA y palpación. El porcentaje de preñez a los 28 días con prueba Elisa fue de 47.6% en comparación al diagnóstico de palpación rectal a los 60 días que fue de 40.7%. No hubo diferencia ($P>0.05$) entre ambas técnicas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Porcentaje de preñez con prueba ELISA y Palpación.

Método	Preñez %	Vacas
ELISA (28 días)	47.6	69/145
Palpación (60 días)	40.7	59/145
Probabilidad		0.237

No hubo diferencia entre la detección de preñez con la prueba ELISA y la palpación rectal. Con una mínima diferencia de 6.9% nos dice que el método ELISA con el Kit IDEXX es muy preciso y esta diferencia puede verse afectada por factores como muerte embrionaria o habilidad de la persona al momento de realizar el diagnóstico con la ayuda del kit (Cuadro 1).

Porcentaje de reabsorción embrionaria. Fue de 14.5%, el cual se encuentra dentro del rango permitido para producción de hatos lecheros que es menor al 15%, porcentajes por encima de este, indica problemas reproductivos en el hato representando pérdidas por gestación. El porcentaje de preñez obtenido se puede ver afectado al porcentaje de reabsorción, aunque este está dentro de lo permitido afectó a la preñez del hato (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentajes de reabsorción embrionaria.

Diagnóstico	Resultados %	Vacas
Preñez	40.7	59/145
Reabsorción embrionaria	14.5	10/69*

*Total de vacas que estuvieron preñadas. 10 es el número de muertes embrionarias.

Para verdaderos positivos y verdaderos negativos los porcentajes fueron de 39.3 y 51.0%, respectivamente. El porcentaje de verdaderos se ve afectado por el bajo porcentaje de vacas preñadas detectadas con el test. Aquellas vacas que dieron como resultados preñadas a los 28 días y luego en la palpación a los 60 días salieron vacías fueron consideradas como reabsorción embrionaria que fue de 14.5% el cual se encuentra dentro del porcentaje aceptado en un hato de producción lechera que es <15%, pero aun así el porcentaje es elevado el cual afecta al porcentaje de preñez en el hato. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentajes de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos negativos, sensibilidad y especificidad en el diagnóstico con prueba ELISA a los 28 días de gestación y palpación a los 60 días.

Diagnóstico	Vacas	Resultados %
Verdaderos positivos	57/145	39.3
Verdaderos negativos	74/145	51.0
Reabsorción Embrionaria	10/69	14.5
Falsos Negativos	2/69	2.9
Sensibilidad	59/69	85.5
Especificidad	74/76	97.4

Sensibilidad. Fue de 85.5% el cual se encuentra debajo del establecido por la casa comercial IDEXX que es de 99.3%, esto se debe a la cantidad de reabsorciones embrionarias obtenidas que afectan al porcentaje de preñez en el hato.

Especificidad obtenido fue de 97.4% superior al establecido por IDEXX que fue de 95.6%, esto es importante ya que lo que se busca con la prueba Elisa para detección temprana de preñez mediante el kit IDEXX es identificar las vacas vacías con mayor certeza para que estas puedan ser re enroladas (Cuadro 3).

Para obtener los valores de los porcentajes de sensibilidad y especificidad se realizó una figura en la cual muestra el procedimiento para obtener dichos valores (Figura 1).

	Preñadas	Vacías	
Preñadas	57	12	$\Sigma 57+12 = 69$
Vacías	2	74	$\Sigma 2+74 = 76$

Sensibilidad: $59/69 = *100 = 85.5\%$
Especificidad: $74/76 = *100 = 97.4\%$

Figura 1. Procedimiento del cálculo de porcentajes de sensibilidad y especificidad.

Costo de la implementación del Kit IDEXX como herramienta adicional es de US\$ 500, dando así un precio unitario por vaca de US\$ 500/80 vacas = US\$ 7.25/vaca. Por lo que por cada US\$ 1 invertido en detección de celo con IDEXX Bovine Pregnancy[®] se obtiene una tasa marginal de retorno de US\$ 5.9 con celo natural y US\$ 10.34 con celo sincronizado (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tasa interna marginal de retorno de la implementación del Kit IDEXX.

Método	Días	Servicio	Ahorro días	Ahorro \$ ^a
Celo natural	148	2	0	0
Celo Sincronizado	148	3	0	0
IDEXX Celo natural	134	3	-14	42
IDEXX Celos sincronizado	123	3	-25	75

US\$ 1= 22.15

a = el ahorro potencial se calcula en base a un costo de mantenimiento de US\$ 3.00 por vaca por día.

4. CONCLUSIONES

El uso del Kit IDEXX Bovine Pregnancy[®] para detección temprana de preñez 28 días post servicio, permitió determinar las vacas vacías con una especificidad alta.

La sensibilidad del Kit IDEXX Bovine Pregnancy[®] para la detección de vacas gestantes fue alta aunque debajo del porcentaje establecido.

El Kit IDEXX Bovine Pregnancy[®] además de la determinación de preñez, permitió identificar por medio de la palpación (60 días) las vacas que presentaron reabsorción embrionaria.

El porcentaje de detección de preñez con Kit IDEXX Bovine Pregnancy[®] a los 28 días y la palpación (60 días) no presentaron diferencia.

5. RECOMENDACIONES

Utilizar el Kit IDEXX Bovine Pregnancy® como una herramienta adicional para la detección temprana de preñez a los 28 días post servicio.

Utilizar el Kit IDEXX para el monitoreo y dar seguimiento a las vacas con problemas reproductivos después del servicio.

Realizar el estudio con un número mayor de vacas en diferentes haciendas en el trópico.

Realizar un análisis de costos.

6. LITERATURA CITADA

Berrios, J. 2014. Prosegan. Que es la palpación. Consultado 7 de Julio de 2015. Disponible en <http://jairoserano.com/2014/03/que-es-la-palpacion-rectal/>.

Catena, M. 2014. Mortalidad embrionaria bovina. Fallas reproductivas durante la gestación temprana. Consultado 7 de Julio de 2015. Disponible en http://www.researchgate.net/publication/263734499_Mortalidad_embriionaria_bovina.

Castellanos Juarez, L., J. Matta Reyes. 2014. Detección temprana de preñez con ultrasonido en tiempo real UTR en bovinos. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. p. 1-3.

Del Cura, A. 2015. Mortalidad embrionaria en ganado vacuno de alta producción. Revista Cria y Salud (en línea). Consultado el 3 de Septiembre de 2015. Disponible en: <http://www.axoncomunicacion.net/criaysalud/documentos/revista.pdf>.

Diskin, M., D. Morris. 2008. NCBI. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. Consultado el 7 de Julio de 2015. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18638133>.

Gélvez, L. 2014. Muerte embrionaria y aborto en el ganado bovino. Mundo pecuario. Consultado el 7 de Julio de 2015. Disponible en http://mundo-pecuario.com/tema252/reproduccion_bovinos/muerte_embriionaria_aborto-1500.html.

Gutiérrez, C. 2006. Evaluación de la validez de pruebas diagnósticas. Sección de Epidemiología y Estadística, Facultad de Medicina – UNMSM. (en línea). Consultado el 3 de octubre de 2015. Disponible en <http://www.epiredperu.net/EstadisticaSanfer/docs/1501-pruebasdiagnosticas.pdf>.

IDEXX. 2015. Diagnósticos innovadores y tecnologías de IDEXX Laboratories. Consultado el 14 de Junio de 2015. Disponible en <http://www.idexx.es/corporate/home.html>.

Perea, F. 2006. Ecografía reproductiva. Núcleo Universitario Rafael Rangel, Universidad de Los Andes. (en línea). Consultado el 3 de septiembre de 2015. Disponible en http://avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/manual-ganaderia/seccion8/articulo1-s8.pdf.

Robles, T. 2014. Diagnóstico de gestación por palpación rectal en bovinos. Fundación produce Sinaloa A.C. Consultado el 6 de Julio de 2015. Disponible en <http://www.fps.org.mx/divulgacion/attachments/article/883/Diagnostico%20de%20gestacion%20por%20palpacion%20rectal%20en%20bovinos.pdf>.

Román, N. 2014. Altagenetics. Beneficios del uso del ultrasonido. Consultado el 7 de Julio de 2015. Disponible en http://web.altagenetics.com/mexico/DairyBasics/Details/8436_Beneficios-del-uso-del-ultrasonido.html.

S.A.S. 2013 S.A.S. User guide: Static S.A.S. Institute, Inc., Cary, N.C.

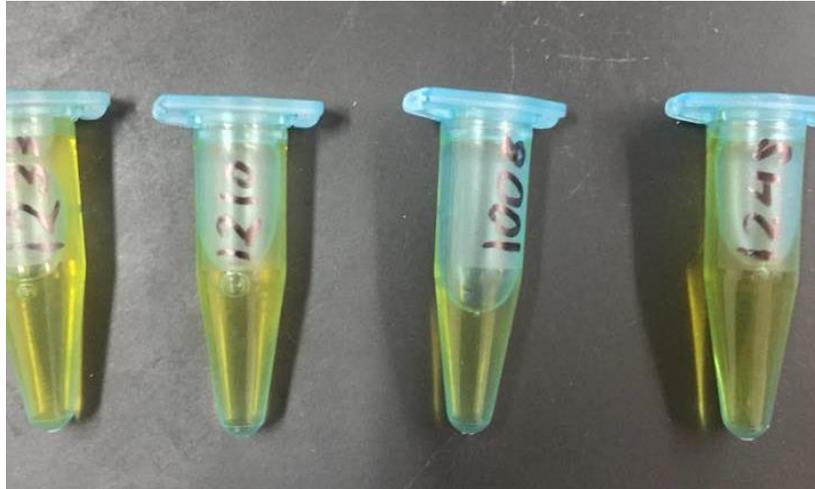
Tamayo, M. 2007. La ecografía como medio de diagnóstico y evaluación de los procesos reproductivos en el bovino (en línea). Consultado el 3 de septiembre de 2015. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/ecografia_ultrasonido/36-ecografia_reproduccion.pdf.

7. ANEXOS

Anexo 1. Muestra de sangre centrifugada por 3 min a 700 revoluciones para extraer el plasma donde se encuentra las enzimas asociadas a la preñez de la vaca.



Anexo 2. Plasma sanguíneo extraído y colocados en tubos *ependorf* para un mejor manejo de las muestras, ya sea para almacenamiento o realizar la prueba instantáneamente.



Anexo 3. Detección de preñez a los 28 días con el Kit IDEXX Bovine Pregnancy[®]. Los pocillos de color azul son las vacas preñadas y los pocillos transparentes vacas vacías.

