

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA

DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM BOVINOS LEITEIROS

GUSTAVO STREL CZUK

PORTO ALEGRE

2015/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA

DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM BOVINOS LEITEIROS

Autor: Gustavo Strelczuk

Monografia apresentada à faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para  
obtenção da Graduação em Medicina  
Veterinária

Orientador: Prof. Dr. João Batista Souza  
Borges

PORTO ALEGRE

2015/1

## RESUMO

Este trabalho aborda a importância do diagnóstico precoce de gestação em bovinos leiteiros para a eficiência reprodutiva do rebanho e os principais métodos de diagnóstico de prenhez existentes, considerando: suas indicações, limitações e custos para execução. A precisão e a precocidade do diagnóstico de prenhez em rebanhos bovinos são fatores de grande relevância para a manutenção da eficiência reprodutiva. É uma ferramenta fundamental para detecção de problemas de fertilidade tanto do rebanho como individuais. Além disso, a detecção da prenhez desempenha um papel importante tendo em vista sua relação com o retorno econômico da atividade para o produtor. O conhecimento do estabelecimento ou não da prenhez através do diagnóstico precoce permite a tomada de decisões que podem interferir nos índices de produtividade da propriedade. Também possibilita que os programas de indução e sincronização de estros utilizados pelas propriedades sejam avaliados mais rapidamente quanto a sua eficiência. Atualmente, diversos métodos de diagnóstico de prenhez podem ser utilizados como: controle da manifestação de estro, palpação transretal, ultrassonografia, testes químicos e detecção de proteínas específicas da prenhez.

Palavras-chave: bovinos leiteiros; prenhez; eficiência reprodutiva; diagnóstico; estro.

## **ABSTRACT**

*This paper discusses the importance of early pregnancy diagnosis in dairy cattle for reproductive efficiency of the herd and the main existing pregnancy diagnostic methods, considering: its indications, limitations and costs for execution. The precision and the early diagnosis of pregnancy in cattle herds are very important factors for maintaining reproductive efficiency. It is an essential tool for the detection of herd or individual fertility issues. In addition, the detection of pregnancy plays an important role in view of its relationship with the economic return of activity to the producer. Knowledge of the establishment or not of pregnancy through early diagnosis enables to take decisions that can interfere with the farm's productivity. It also enables induction of estrus and synchronization programs used by the properties to be evaluated more quickly as their efficiency. Currently, many pregnancy diagnostic methods may be used as control estrus, transrectal palpation, ultrasound, chemical testing and detection of pregnancy-specific proteins.*

*Keywords: dairy cattle; pregnancy; reproductive efficiency; diagnosis; estrus.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a minha família e a todos aqueles que de alguma forma participaram direta ou indiretamente da minha formação nestes últimos anos.

Faço um agradecimento em especial ao meu orientador, Prof. João Batista, pela disponibilidade, apoio e orientação para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
2	<b>ASPECTOS ECONÔMICOS DO DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO</b> .....	11
3	<b>IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO</b> .....	13
4	<b>DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM BOVINOS LEITEIROS</b> .....	14
4.1	<b>Controle da manifestação de estros</b> .....	14
4.2	<b>Palpação transretal</b> .....	15
4.2.1	Deslizamento da membrana fetal.....	15
4.2.2	Vesícula amniótica .....	16
4.2.3	Placentomas .....	17
4.2.4	Feto.....	17
4.3	<b>Testes químicos para detecção de prenhez</b> .....	19
4.3.1	Progesterona.....	19
4.3.2	Sulfato de estrona.....	22
4.4	<b>Detecção de proteínas específicas da prenhez</b> .....	22
4.4.1	Fator de prenhez precoce .....	22
4.4.2	Proteínas específicas da prenhez bovina .....	23
4.5	<b>ULTRASSONOGRAFIA</b> .....	26
5	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	29
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O desenvolvimento do concepto em uma vaca gestante.....	19
Figura 2 – Representação esquemática do dia de coleta de amostra para o diagnóstico de prenhez através da P4 no leite.....	21
Figura 3 – Níveis de PAGs no leite ao longo da gestação em vacas da raça Holstein.....	25
Figura 4 – Esquema representativo com os períodos da gestação a partir dos quais cada técnica de diagnóstico de prenhez pode ser empregada.....	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

IPC - Intervalo parto-concepção

IEP - Intervalo entre partos

IA - Inseminação artificial

IATF - Inseminação artificial em tempo fixo

P4 - Progesterona

ELISA - *“Enzyme linked immunosorbent assay”*

RIE - Radio-imuno-ensaio

TIR - Teste de inibição da roseta

EPF - *“Early pregnancy factor”*

bPAG - *“Bovine pregnancy-associated glycoprotein”*

APCBRH - Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa

US – Ultrassom

## 1 INTRODUÇÃO

Na produção leiteira uma taxa de prenhez reduzida e um maior intervalo entre partos diminuem a produção de leite e aumentam o custo de manutenção das vacas secas e de descarte. Para vacas leiteiras um intervalo entre partos maior de 12 meses pode representar uma perda substancial de renda e de progênie por vaca ou rebanho por ano (GORDON *et al.*, 1996). Um problema frequentemente enfrentado pelos produtores é que, embora haja uma proporção de vacas que aparentem estar prenhes após o acasalamento, o verdadeiro percentual não é conhecido tão cedo quanto seria desejável. Segundo Hansen e Arechiga (1999), vacas em lactação submetidas à temperatura ambiente e umidade relativa do ar elevadas apresentam redução da manifestação de estro, das taxas de ovulação e maiores perdas embrionárias.

O diagnóstico precoce de gestação é uma ferramenta que permite ao produtor remover novilhas e vacas não produtivas do rebanho, evitando desperdício de alimento, reduzindo períodos improdutivo e aumentando a produção de leite. Com isso é possível identificar aquelas que não emprenharam de modo que elas possam ser novamente inseminadas, tratadas ou eliminadas do rebanho.

Ao longo do tempo, métodos mais precisos para determinação de prenhez de vacas e outros animais domésticos têm sido desenvolvidos, incluindo a observação comportamental, exame físico, testes químicos e uso de instrumentos eletrônicos (YOUNGQUIST *et al.*, 1997). O teste ideal deve ser capaz de detectar com precisão a prenhez antes do primeiro estro esperado após a inseminação (cerca de 21 dias) para que a vaca possa ser reinseminada ainda mais cedo, evitando que se perca este tempo. Atualmente não existem testes disponíveis que sejam práticos de usar e permitam a detecção de prenhez em vacas antes do retorno ao estro (YOUNGQUIST *et al.*, 1997).

O diagnóstico precoce da prenhez em bovinos tem uma importância intrínseca permitindo maior controle do manejo reprodutivo do rebanho e redução de perdas econômicas pela detecção precoce de problemas de fertilidade. Também possibilita que os programas de indução e sincronização de estros utilizados pelas propriedades sejam avaliados mais rapidamente quanto a sua eficiência.

Este trabalho tem como objetivo revisar a bibliografia quanto à importância do diagnóstico precoce de gestação em bovinos leiteiros para a eficiência reprodutiva do rebanho

e abordar os principais métodos de diagnóstico de prenhez existentes considerando suas indicações, limitações e custos para execução.

## 2 ASPECTOS ECONÔMICOS DO DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

A eficiência reprodutiva do rebanho leiteiro é um dos componentes mais importantes no desempenho econômico de uma propriedade. Pode-se definir eficiência reprodutiva como a habilidade de fazer a vaca se tornar gestante rapidamente após o parto e com o menor número de coberturas ou inseminações possível.

O desempenho reprodutivo do rebanho deve ser medido através de indicadores, assim, para alcançar um ótimo desempenho reprodutivo do rebanho cada fêmea deve ter um parto a cada 12-13 meses, deve conceber entre 75 e 85 dias pós-parto e ter o primeiro parto aos 24 meses de idade (Tabela 1). O alcance destes objetivos depende da detecção de estro, iniciando por volta de 40 dias pós-parto, e os animais sendo inseminados para conceberem entre 85 e 115 dias pós-parto.

Tabela 1. Principais parâmetros utilizados para avaliar a eficiência reprodutiva de bovinos de leite.

<b>PARÂMETRO</b>	<b>VALOR ( Metas desejadas)</b>
1. Intervalo entre Partos (dias)	12 a 13 meses
2. Intervalo parto concepção	85 a 105 dias
3. % de vacas diagnosticadas prenhes/mês	8 a 9%
4. % de vacas diagnosticadas vazias a mais de 150 dias	< 10%
5. % de descarte anual por infertilidade	<6%
6. Taxa de concepção ao primeiro serviço	50 a 60%
7. Serviço por concepção	1,7 a 2,2
8. Idade média ao 1º parto	24 a 25 meses
9. Média de lactações/ vaca no rebanho	>3
10. Taxa de abortos/ano	<5%

Fonte: GOTTSCHALL *et al.*, 2002.

Segundo Gottschall (1997), o monitoramento do intervalo parto-concepção (IPC) constitui uma importante ferramenta para o incremento da eficiência reprodutiva por estar intimamente associado ao intervalo entre partos (IEP). A falha na detecção de estros reflete as falhas de manejo e registro de dados, comprometendo a eficiência reprodutiva do rebanho, o que, por sua vez, prejudica todos os índices produtivos. Algumas enfermidades metabólicas e puerperais, bem como a deficiência na detecção de estro, podem ser responsáveis por subfertilidade, prolongando o intervalo parto-concepção (STEVENSON ; CALL, 1988; ESSLEMONT, 1993). Se a prenhez for retardada, a ineficiência reprodutiva corrobora para

uma produção leiteira ineficiente. Assim, pode-se aumentar a lucratividade do rebanho de forma significativa se os problemas reprodutivos forem minimizados através de conhecimento, identificação e ajustes dos principais indicadores reprodutivos.

Para controlar a reprodução de rebanhos leiteiros pode-se lançar mão de ferramentas como: estabelecimento de protocolos sanitários para controle de enfermidades (programas de vacinação contra doenças reprodutivas), controle do ciclo estral através de programas de sincronização de estros e da ovulação, manejo da inseminação artificial (IA) (detecção de estros e inseminação artificial em tempo fixo [IATF]) e implantação de métodos de diagnóstico precoce de gestação.

O diagnóstico precoce de gestação possibilita que vacas não gestantes sejam identificadas e, conseqüentemente, medidas sejam tomadas para reduzir as perdas na produção de leite devido a um maior IPC. Os benefícios econômicos do diagnóstico precoce de gestação dependem de vários fatores, tais como o tempo após a inseminação em que diagnóstico é realizado, a precisão do diagnóstico, o seu efeito sobre a mortalidade embrionária, a eficiência de detecção de estro, e as medidas tomadas quando as vacas não estiverem gestantes.

Cada método de diagnóstico precoce de gestação possui particularidades quanto ao seu custo e sua execução. Os testes diretos como a palpação transretal e a ultrassonografia podem diferir quanto aos honorários do médico veterinário. Os profissionais que lançam mão da ultrassonografia agregam valor ao serviço devido ao investimento despendido para a aquisição do aparelho.

Os testes indiretos como os testes químicos e a detecção de proteínas específicas da prenhez têm seus custos relacionados ao material para coleta, transporte e análise das amostras, podendo variar bastante conforme o número de animais e a logística para o transporte das amostras, o qual depende da localidade onde se encontra a propriedade em relação ao laboratório destino. O tempo necessário para a obtenção dos resultados destes testes também influencia, pois este intervalo entre a coleta e o resultado nas mãos do produtor define se o teste trará algum benefício em relação à precocidade do diagnóstico frente a outros métodos para a tomada de decisões.

### **3 IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO**

O diagnóstico precoce de prenhez em vacas leiteiras diferenciando vacas prenhes de não gestantes proporciona maior oportunidade para que medidas sejam tomadas como a nova inseminação ou o descarte de vacas inférteis (DE VRIES, 2005). Também possibilita que os programas de indução e sincronização de estros utilizados pelas propriedades sejam avaliados mais rapidamente quanto a sua eficiência. A programação do diagnóstico de gestação é um componente fundamental nos programas de controle de saúde reprodutiva dos rebanhos (THOMPSON *et al.*, 1995).

Para a implantação do diagnóstico precoce de gestação em propriedades leiteiras deve-se levar em consideração a programação de atividades e a rotina de manejo das mesmas para que o uso desta ferramenta seja eficiente. Deve-se ter controle da manifestação de estros para que as vacas que permanecerem não gestantes após a IA sejam reinseminadas. Para que isto ocorra, é importante que os funcionários sejam capazes de identificar a manifestação de estro nas vacas, que haja disponibilidade de inseminadores, a fim de que o intervalo parto-concepção não seja prolongado.

## 4 DIAGNÓSTICO PRECOCE DE GESTAÇÃO EM BOVINOS LEITEIROS

Custos crescentes de mão-de-obra e alimentação dos animais na produção de leite e a constante seleção genética permitiram produzir animais com capacidade de produção de leite muito maior o que tem aumentado a importância da máxima fertilidade e, em certas condições para muitos rebanhos, um intervalo entre partos de um ano tornou-se o alvo dos produtores eficientes (HICKEY, 1990).

Diversos métodos de diagnóstico de prenhez têm sido utilizados como o controle da manifestação de estros, palpação transretal, ultra-sonografia e testes químicos, cada um com suas particularidades; não existe um teste ideal e, sim, o mais adequado para cada situação. Os métodos mais comuns para diagnosticar a prenhez em vacas são a palpação transretal e a ultra-sonografia. O diagnóstico de gestação por palpação transretal é o procedimento mais realizado (ROSENBAUM; WARNICK, 2004), mas o uso do ultra-som na clínica veterinária é cada vez maior (FRICKE, 2002).

### 4.1 Controle da manifestação de estros

Se a vaca estiver prenhe após a cobertura ou IA, em torno de 15 a 17 dias após a ovulação, o embrião sinaliza sua presença e o corpo lúteo é mantido, interrompendo o ciclo estral materno. O não retorno ao estro entre 18-24 dias após o serviço ou IA sugere que a concepção ocorreu. Em geral, a prenhez é a causa mais comum de falha do retorno ao estro da vaca após a cobertura ou IA (ZEMJANIS *et al.*, 1969). Vacas leiteiras não detectadas em estro 21 dias após IA geralmente são consideradas como prenhes. A eficiência na detecção de estro varia muito entre os observadores e entre propriedades leiteiras, e geralmente é mais baixa do que seria desejável, não tendo precisão suficiente para ser usada como diagnóstico. Mesmo com uma alta taxa de detecção de estro, haverá uma percentagem de fêmeas em que não será detectada, sendo assim, dadas como prenhes. Mesmo que estas vacas tenham o estro detectado mais tarde, isso acarretará com uma perda na produção de pelo menos 3 semanas.

Algumas vacas mesmo estando prenhes podem demonstrar sinais de estro de leves a visíveis, podendo ser erroneamente dadas como vazias. A IA de vacas prenhes pode resultar em aborto se o instrumento de inseminação passar completamente através do canal cervical e as membranas fetais forem rompidas (CAVESTANY *et al.*, 1985).

## 4.2 Palpação transretal

Segundo Cowie (1948), a palpação transretal do útero para o diagnóstico de gestação em bovinos foi descrita pela primeira vez em 1800 e é o método mais antigo e mais usado para diagnóstico precoce de gestação em bovinos leiteiros hoje.

Vários estudos têm sugerido que a análise de vacas prenhes no início da gestação por palpação transretal aumenta o risco de mortalidade embrionária iatrogênica (ABBITT *et al.*, 1978;. FRANCO *et al.*, 1987;. PAISLEY *et al.*, 1977;. VALLIANCOURT *et al.*, 1979; WHITE *et al.*, 1989), embora outros tenham sugerido que as vacas submetidas à palpação transretal mais cedo durante a gestação tiveram uma diminuição do risco de aborto ou que a palpação não teve efeito sobre as perdas embrionárias subsequentes (THURMOND; PICANSO, 1993).

Embora ainda haja controvérsia quanto à mortalidade embrionária iatrogênica induzida por palpação transretal, outros fatores têm maior influência sobre as taxas de parto do que o exame de prenhez por palpação transretal. Em um estudo realizado por Alexander (1995), o autor relata que apenas cerca de 5% de conceptos palpados não chegaram a termo e que estas perdas fetais ocorreram entre os dias 35 e 70 de gestação.

Embora alguns métodos e a habilidade do operador possam aumentar a incidência de morte fetal, é provável que a palpação transretal de vacas entre 40 e 45 dias de gestação seja um método seguro e confiável, quando bem executada. Dependendo da habilidade do operador e da idade e tamanho da vaca, a palpação transretal é útil para diagnosticar a prenhez a partir do dia 30 até o termo.

De acordo com Youngquist (1997), embora tamanho, textura, localização, e o conteúdo do útero variem muito durante a gestação, quatro sinais positivos de prenhez detectáveis por palpação transretal são reconhecidos:

- O deslizamento das membranas fetais
- A vesícula amniótica
- Identificação dos placentomas
- Palpação do feto

### 4.2.1 Deslizamento da membrana fetal

Em torno dos 35-40 dias de gestação, é possível palpar a membrana corio-alantóide. A vaca possui a placenta do tipo cotiledonar em que o corio-alantóide só está ligado ao endométrio uterino na área caruncular. Conforme Noakes (1985), a corio-alantóide pode ser identificada como um delicado tecido que pode ser sentido ao escapar dos dedos pouco antes da parede do corno uterino durante a palpação.

Se a vaca está prenhe, a membrana corio-alantóide pode ser sentida através do deslizamento dos dedos em frente à parede uterina. Este deslizamento da membrana pode ser sentido no corno uterino gravídico com 30 dias de gestação, porém pode ser detectada de forma mais confiável pelo dia 35. O deslizamento da membrana fetal pode ser detectado com mais facilidade no corno não gravídico até aproximadamente o dia 70 de gestação. Durante a gestação precoce, as membranas fetais são delicadas, sendo necessário um toque cuidadoso e experiência para reconhecer este sinal de prenhez. Balls e Peters (2004) aconselham que esta técnica não seja praticada rotineiramente, uma vez que, em alguns casos, pode danificar a placenta, e resultar em morte fetal e aborto.

#### 4.2.2 Vesícula amniótica

O âmnio contém o concepto em desenvolvimento e o líquido amniótico, e pode ser palpado aos 28 dias após concepção em novilhas e aos 32 a 35 dias em vacas pluríparas.

A vesícula é reconhecida como uma estrutura quase esférica, túrgida, cheia de líquido com cerca de cerca de 1 cm de diâmetro aos 28 dias e aumenta de tamanho conforme o avanço da gestação. A vesícula amniótica pode ser detectada pelo examinador ao circundar o corno uterino com o polegar em um lado e o dedo indicador no outro. Ela fica flutuante dentro do útero, mas é encontrada na extremidade cranial do ligamento intercornual (figura 1). A vesícula amniótica torna-se progressivamente menos túrgida e mais difícil reconhecer a partir de 65 dias de gestação.

Nesse período, a vesícula fica menos tensa e o feto torna-se palpável. Num concepto bovino, o coração é externo até aproximadamente o dia 42, portanto, deve-se ter cuidado na tentativa de detectar a prenhez, pois a aplicação de pressão indevida na vesícula amniótica pode provocar ruptura do coração ou outros órgãos frágeis. A ruptura intencional da vesícula amniótica tem sido utilizada como um método para provocar aborto em bovinos (BALL *et al.*, 1963).

### 4.2.3 Placentomas

Em ruminantes, os cotilédones da placenta fetal lançam vilosidades que se projetam em criptas das carúnculas maternas formando os placentomas. Estão presentes a partir de 75-120 carúnculas maternas dispostos em duas linhas dorsais e duas ventrais no útero das vacas. A formação dos placentomas se dá no início da gestação e elas atingem tamanho suficiente para serem palpáveis aos 75-80 dias de gestação. Em um trabalho realizado por Wahid (1991), foi registrado um número de placentomas variando de 37-63 no corno gravídico e 26-49 no corno não-gravídico.

O tamanho dos placentomas varia com a fase de gestação e sua localização no útero. Os placentomas são progressivamente maiores na metade do corno uterino gravídico e são menores nos pólos do colo uterino e dos ovários. Eles são maiores cranialmente ao colo do útero, local onde são palpados para estimar o estágio da prenhez. Os placentomas são identificados pelo examinador ao fixar uma dobra longitudinal da parede do útero e do rolamento desta entre o polegar e dedos. Numa prenhez mais avançada o examinador pode palpar estas estruturas passando a mão sobre a parede uterina. Os placentomas permanecem palpáveis por um tempo variável após morte do conceito, e a detecção da sua presença pode, em alguns casos, resultar em um diagnóstico falso positivo de prenhez.

Um diagnóstico falso negativo é possível durante o 5º ao 6º mês de gestação, quando o útero desce completamente e pode estar fora de alcance, especialmente em vacas de grande porte ou para examinadores com braços curtos. Este erro pode ser evitado se o examinador procurar outros sinais de gestação antes de declarar prenhe a vaca, ou identificar um útero normal, com cornos uterinos simétricos, estabelecendo o diagnóstico negativo de prenhez.

### 4.2.4 Feto

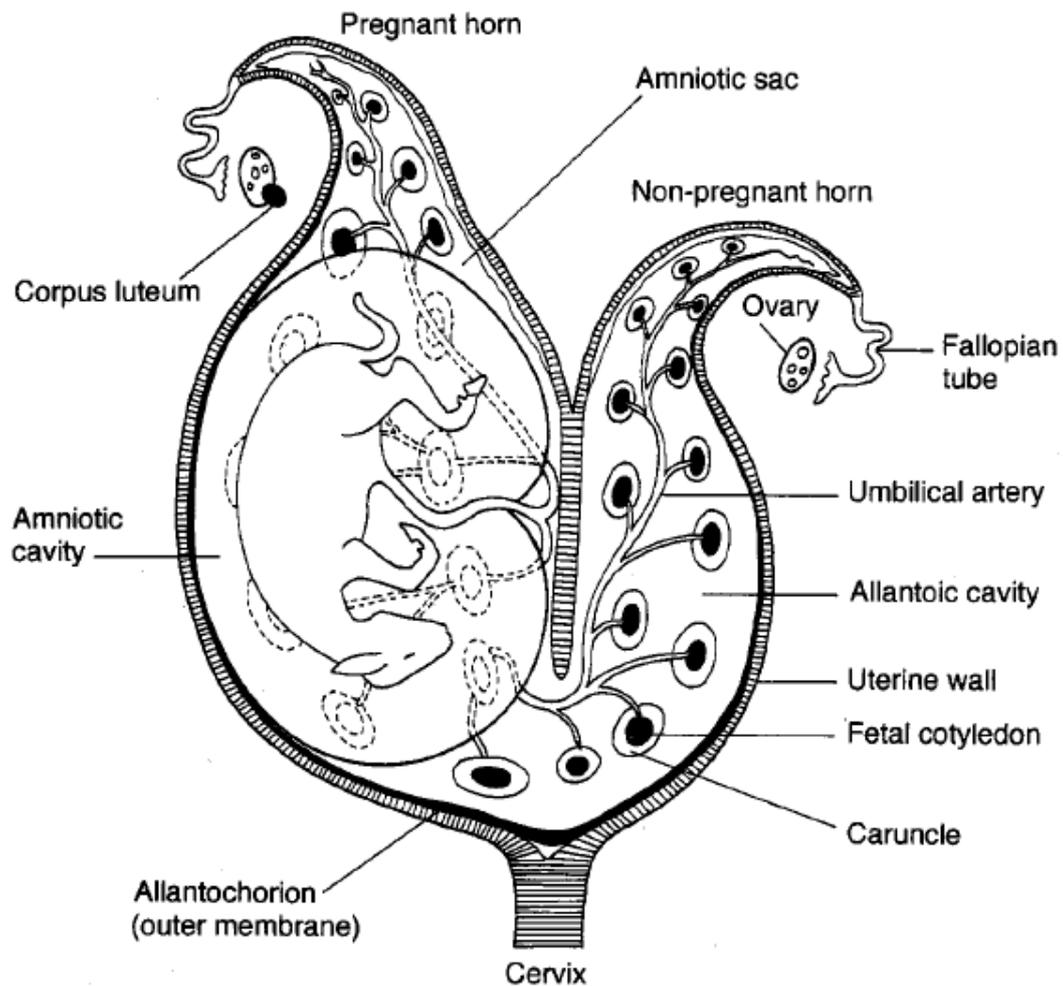
O feto se torna palpável com cerca de 65 dias, quando a membrana amniótica perde a turgidez (GORDON, 1996; YOUNGQUIST, 1997). Nos estágios iniciais da gestação, o feto pode ser sentido diretamente. Mais tarde, em torno de 7 meses de gestação, o feto pode ser detectado por baloteamento, que consiste em balançar a mão contra a parede uterina movimentando os fluidos fetais e reconhecendo o feto por rebote contra a mão. O feto é facilmente palpável tendo livre flutuação, estrutura firme dentro do útero durante os primeiros 4 meses de gestação cheio de fluido. Com o avanço da gestação, o aumento do peso do feto puxa o fluido uterino ventralmente e cranialmente até que o feto que passa a se encontrar no

assoalho abdominal durante o quinto e sexto mês. O contínuo crescimento do feto posiciona-o mais perto da pelve materna durante o último terço da gestação (período de subida), de modo que a palpação do feto é facilitada (GORDON, 1996).

Roberts (1986) sugere que é possível palpar o feto em mais de 95% das vacas durante o terceiro e quarto mês de gestação, em 40% a 70% de vacas durante o quinto e sexto meses, em 80% ao sétimo mês, e em mais de 95% durante o oitavo e nono mês. Diagnósticos falsos negativos são mais prováveis se a palpação do feto para diagnóstico de prenhez for realizada entre o quinto e sétimo meses. Os erros podem ser evitados se a vaca for examinada por outros sinais de prenhez ou se um útero não-gravídico é identificado.

O diagnóstico falso positivo é possível se outra estrutura materna normal for confundida com um feto, como o saco dorsal do rúmen e o rim esquerdo. Estruturas anormais também podem ser confundidas com um feto ou parte dele, como tumores de ovário e útero, aumento dos gânglios linfáticos, aderências e do tecido conjuntivo secundário a trauma cirúrgico ou obstétrico anterior, e necrose de gordura abdominal. Fetos mumificados podem ser encontrados e confundidos com uma prenhez normal, se o exame for superficial. Embora um feto mumificado possa se aproximar do tamanho de um feto viável, múmias são reconhecidas pela falta de fluído uterino e ausência de membranas fetais e placentomas.

Figura 1 - O desenvolvimento do conceito em uma vaca gestante.



Fonte: Gordon (1996).

Os custos de execução da palpação transretal podem variar conforme o médico veterinário que presta o serviço. Alguns técnicos acordam o valor de 1 kg de peso vivo da vaca por animal examinado, enquanto outros cobram diária fixa independente do número de animais examinados.

### 4.3 Testes químicos para detecção de prenhez

#### 4.3.1 Progesterona

Os testes de detecção de prenhez através dos níveis de progesterona (P4) são baseados na exigência da presença deste hormônio para que a gestação se mantenha. A P4 é secretada pelo corpo lúteo funcional a partir do 6º dia após a cobertura ou IA, e pode ser detectada no leite ou no plasma, sendo um indicativo precoce de prenhez.

A detecção dos níveis de P4 pode ser realizada através de teste de ELISA (“*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*”), uma alternativa promissora devido a sua simplicidade e precisão. A detecção de P4 também pode ser realizada por radio-imuno-ensaio (RIE), porém é menos frequente devido às complicações inerentes a manipulação e descarte dos materiais radioativos utilizados nesta prova. A detecção de P4 no soro através do teste de ELISA tem como princípio a interação competitiva entre a progesterona e o hormônio-enzima conjugado por um número limitado de anticorpos anti-progesterona imobilizados (coelho). A quantidade de hormônio-enzima ligado é inversamente proporcional a concentração de P4 na amostra. A leitura desta prova é feita através da absorbância da amostra através de um leitor de ELISA e, caso a concentração obtida seja desconhecida, este resultado é interpolado em curva padrão gerada pela utilização dos calibradores com concentrações conhecidas.

A detecção de P4 no leite é feita através de um método baseado no uso de anticorpos policlonais de coelho contra a progesterona e progesterona-rábano-peroxidase conjugada, que funciona como enzima conjugada. A quantificação é feita por meio de uma reação colorimétrica entre a rábano-peroxidase e o reagente 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina.

Além destes métodos, nos Estados Unidos há disponível um teste comercial chamado P4 Rápida (“*P4 Rapid – Progesterone Heat Detection Test*”, Lancaster DHIA, Manheim, PA), capaz de identificar se o nível de P4 é alto ou baixo através de amostras de leite. Este teste consiste em uma fita que é submersa em uma amostra de leite por 5 minutos e após é feita a leitura. Se a fita revelar duas linhas coradas indica que a vaca está ciclando e não está prenhe; se revelar apenas uma linha corada, a vaca pode estar no diestro ou estar prenhe. Em caso de suspeita de prenhez deve ser realizado outro teste, o “*IDEXX Milk Elisa Pregnancy Analysis Test*” que será comentado mais adiante.

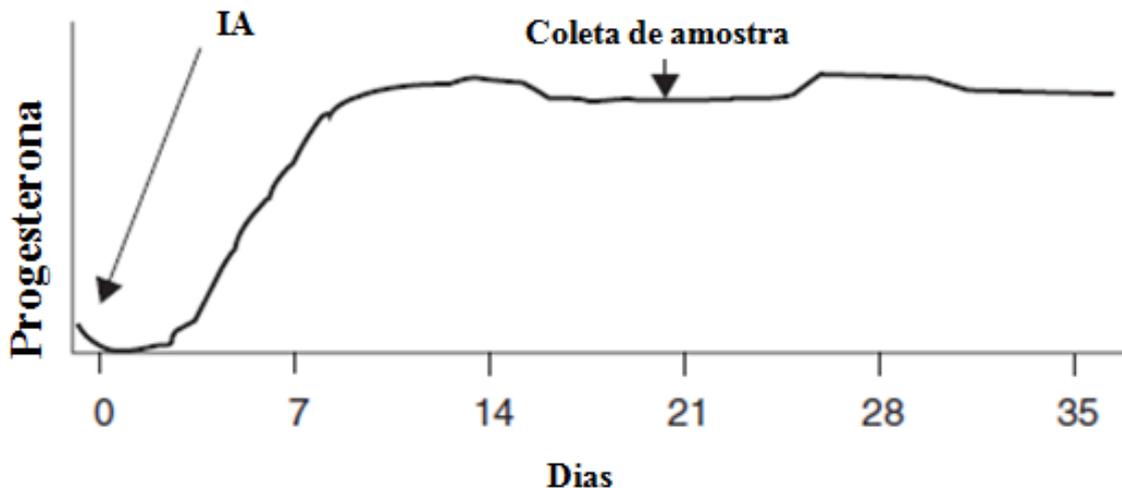
O “*P4 Rapid – Progesterone Heat Detection Test*”, que tem um custo de U\$ 4,50 por amostra, é um bom indicativo de prenhez que pode ser utilizado a partir de 35 dias pós-parto. A grande vantagem deste teste é que possibilita que a prova seja realizada na propriedade sem a necessidade de envio de amostra para laboratório, o que reduz o custo de execução e também o tempo para obtenção do resultado.

A P4 é secretada pelo corpo lúteo durante toda a gestação e seus valores de pico são geralmente alcançados por volta do dia 10 após a ovulação e são mantidos, enquanto que em

vacas não gestantes os níveis caem por volta do dia 17 do ciclo. Se a vaca emprenhar, ela não retornará ao estro 21 dias após o serviço ou IA e os níveis de P4 no sangue e no leite se manterão elevados em torno do dia 20-24. Se ocorrer o contrário, a vaca não conceber, a concentração de P4 é elevada até aproximadamente o dia 17, quando ocorrerá a luteólise seguida por um declínio acentuado na concentração de P4 durante o dia 20 e retorno ao estro.

Segundo Balls e Peters (2004) a amostra de leite para o teste de ELISA deve ser coletada no dia 20 após a inseminação. Se o nível de progesterona for baixo, a vaca não está prenhe, isso levando em consideração a correta coleta da amostra e funcionamento do teste de detecção. Se o nível de progesterona estiver alto, a vaca pode estar prenhe (Figura 2). A concentração de P4 reflete a funcionalidade do corpo lúteo, mas não necessariamente a presença de um embrião ou feto. Um nível alto de P4 sugere que a vaca esteja prenhe, porém a realização de apenas um teste apresenta apenas 80% de acurácia para diagnósticos positivos de prenhez.

Figura 2 - Representação esquemática do dia de coleta de amostra para diagnóstico de prenhez através da P4 no leite.



Fonte: adaptado de Balls e Peters (2004).

Em rebanhos com histórico de baixa fertilidade e falhas na detecção do estro, o uso dos testes de progesterona com amostras de leite pode ser de grande utilidade para contornar tais dificuldades. Do mesmo modo, o perfil de progesterona durante todo o ciclo estral fornece condições para que seja efetuado, com relativa segurança, o diagnóstico precoce de gestação, pois nos animais gestantes mantêm-se elevado ou em ritmo ascendente em torno do 21º dia pós IA ou monta natural (CAVESTANY *et al.*, 1985).

Em um estudo realizado por Rocha (1993), ele sugere que os valores de progesterona no leite desnatado permitem o acompanhamento da atividade do corpo lúteo no período pós-parto, bem como se mostram adequados para o diagnóstico precoce de gestação aos 21 dias após a IA. Os níveis de P4 estão correlacionados diretamente com a quantidade de gordura no leite, por isso foi utilizado leite desnatado para a realização desta avaliação.

Youngquist (1997) afirma que a medição de progesterona pode ser mais útil no dia da IA para verificar se as concentrações de P4 estão baixas e se a vaca não foi erroneamente identificada como estando em estro e encaminhada para inseminação durante a fase lútea do ciclo estral.

Na prática, a detecção dos níveis de P4 no leite ou no soro é uma boa ferramenta para o diagnóstico precoce de prenhez, devido a sua praticidade e precocidade, porém sua eficiência pode variar muito devido a fatores externos, tais como a localização da propriedade e do laboratório onde serão realizadas as provas, a viabilidade e o tempo do transporte das amostras e o retorno dos resultados das provas.

#### 4.3.2 Sulfato de estrona

O sulfato de estrona é um hormônio produzido pela placenta, presente no leite de vacas prenhes em concentrações suficientes para diferenciação entre vacas prenhes e vazias depois de aproximadamente 100 dias de gestação (PRAKASH *et al.*, 1993; KOURLETAKIBELIBASAKI *et al.*, 1995). A substância é detectada por radio-imuno-ensaio (RIE). Porém, na prática, pelo fato de sua detecção se dar num estado muito avançado a prenhez, o sulfato de estrona não oferece nenhuma vantagem substancial em relação a outros métodos para o diagnóstico precoce de prenhez.

Embora a detecção de vacas não gestantes nesta fase final da prenhez seja de valor limitado para o manejo da reprodução, pode ser usada como um teste de confirmação em sequência a um diagnóstico positivo anterior, tal como um teste de progesterona no leite aos 21-24 dias. Também pode ser usado em casos de suspeita de aborto, associado ao exame clínico do animal (BALL; PETERS, 2004).

### **4.4 Detecção de proteínas específicas da prenhez**

#### 4.4.1 Fator de prenhez precoce

Fator de prenhez precoce (“*Early Pregnancy Factor*” [EPF]) é um complexo de proteínas associadas à prenhez que foi detectado no soro de vários animais prenhes pouco depois fertilização (MORTON *et al.*, 1992; GORDON, 1996). Sua detecção é feita através do Teste de Inibição da Roseta (TIR), uma técnica com fundamento imunológico na qual linfócitos maternos são misturados com as eritrócitos do sangue de outras espécies. Os linfócitos espontaneamente assumem uma forma de roseta, um arranjo similar a uma flor em que um linfócito tem vários eritrócitos do sangue ligados a ele. Linfócitos de animais prenhes formam menos rosetas que os de animais não-prenhes. Se os linfócitos de uma vaca vazia forem incubados no soro sanguíneo de uma vaca prenhe, a capacidade desses linfócitos de formarem rosetas fica diminuída, o que indica que um fator imunossupressor está presente no soro da fêmea prenhe (GORDON, 1996).

Ito (1995) sugere que o útero bovino seja imuno-tolerante devido à ação do EPF. Em um estudo realizado por Sakonju (1993) onde foram coletados embriões de vacas no dia 7 após a IA, foi observado que os valores de TIR no soro foram baixos no dia da IA, aumentaram no dia 3 e mantiveram-se elevados até a coleta de embriões no dia 7. Os valores do TIR diminuíram para um nível baixo por uma semana depois da coleta de embriões. Na prática, o aumento dos valores do TIR serve como um indicativo bastante precoce da ocorrência de fertilização e para o controle de viabilidade de embriões no início da gestação.

#### 4.4.2 Proteínas específicas da prenhez bovina

A proteína específica da prenhez bovina (“*Bovine Pregnancy-associated Glycoprotein*” [bPAG]) pertence a uma família de cinco glicoproteínas secretadas pelas células trofoblásticas que têm sido isoladas, purificadas e caracterizadas (BUTLER *et al.*, 1982). Testes de radio-imuno-ensaios para a medição de PAGs têm sido desenvolvidos e usados para diferenciar vacas prenhes de não gestantes (SASSER, 1986; JOHNSON, 1995). A detecção destas proteínas também pode ser realizada através de teste de ELISA.

Nos Estados Unidos, está disponível o teste de prenhez chamado Idexx Leite (“*The Idexx Milk Pregnancy Test*”, Idexx Laboratories, Westbrook, ME), que trata-se de um kit de ELISA para a detecção de glicoproteínas associadas com a prenhez (PAGs) no leite bovino como um marcador para a prenhez. O teste de prenhez Idexx Leite confirma gestação de 28 dias pós-reprodução e a partir de 60 dias pós-parto. Isso permite aos produtores identificar as vacas não gestantes para assegurar a reinseminação em tempo hábil. Também há disponível

outro kit para soro, o “*Idexx Bovine Pregnancy Test (serum)*”, baseado nos mesmos princípios do teste para leite.

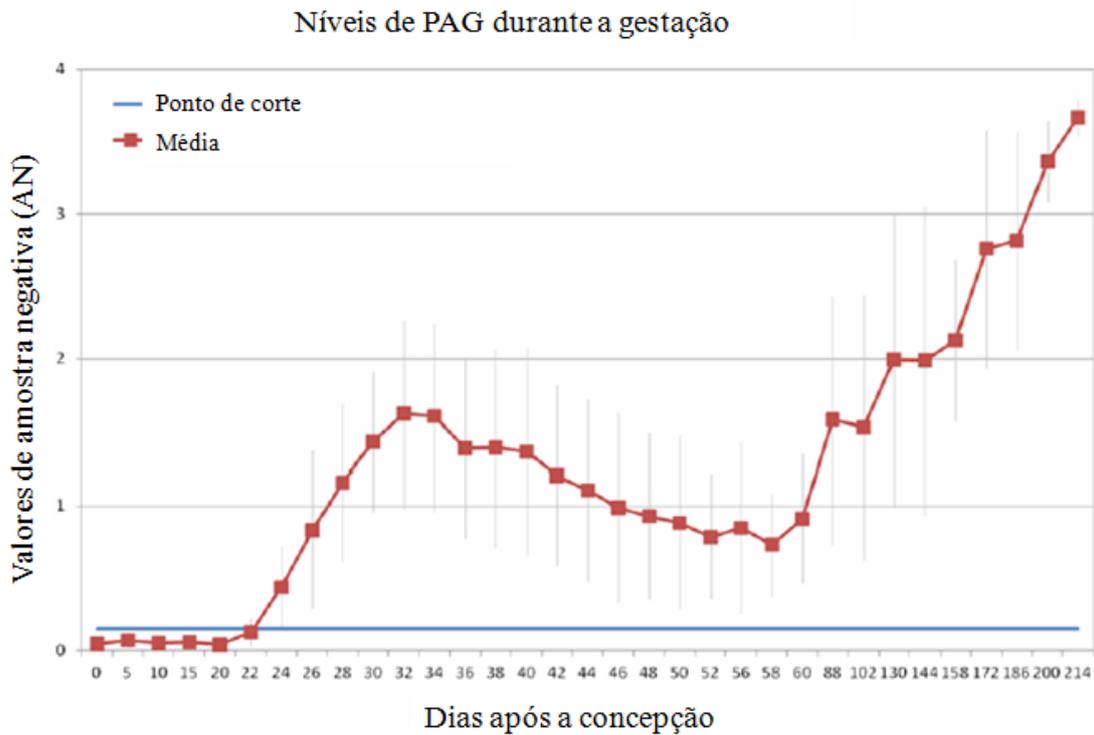
Este teste de ELISA baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais contra a PAG, que são fixados em uma microplaca que captura a PAG presente na amostra. Anticorpos secundários anti-PAG são utilizados como reagente de detecção e um substrato enzimático é utilizado como um indicador de cor para revelar a PAG contida na amostra. Depois de parar a reação, a densidade óptica de cada poço é lida a um comprimento de onda de 450 nm e os resultados são calculados e expressos como amostra - negativa (SN) (Figura 3). Para as amostras de soro, se o resultado for  $\geq 0.3$  as amostras são classificadas como positivas (gestante), e abaixo de 0,30 como negativas (não gestante). Para amostras de leite, se o resultado for  $\geq 0.15$  as amostras são classificadas como positivas (gestante), e abaixo de 0,10 classificado como negativas (não gestantes). Os resultados compreendidos entre 0,10 e 0,15 são classificados como inconclusivos no ensaio leite sendo necessário repetição do teste.

No Brasil o Idexx Leite é utilizado no Estado do Paraná pela Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) e as amostras são processadas em laboratório próprio da associação exclusivamente para seus membros. A recomendação da associação é que o diagnóstico precoce de gestação pela amostra de leite seja realizado aos 28 dias após a cobertura ou IA, com reconfirmação aos 42 dias de prenhez e novamente aos 210 dias.

Na Clínica do Leite da ESALQ-USP (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo), o teste é chamado P-CHECK (Idexx Leite) e pode ser realizado através da mesma amostra que enviada para as análises de CCS (contagem de células somáticas)/composição do leite. A recomendação da Clínica do Leite é que aos 30 dias após a IA/cobertura o diagnóstico de gestação seja feito pelo médico veterinário através de palpação transretal ou ultra-som, e aos 60 e 90 dias de gestação sejam enviadas amostras de leite para a detecção das PAG's.

As PAGs podem ser detectadas em vacas prenhes a partir de 24 dias de gestação. Sinclair (1995) sugere que as concentrações plasmáticas destas proteínas podem ser utilizadas para diagnosticar prenhez e prever a idade fetal, mas recomenda o seu uso após o dia 26 de gestação.

Figura 3 - Níveis de PAGs no leite ao longo da gestação em vacas da raça Holstein.



Fonte: adaptado de Byrem (2009)

Os aumentos na concentração desta proteína com o avanço da gestação são detectáveis até o parto. Em gestações gemelares as concentrações das PAGs são maiores do que em gestações únicas, mas as grandes variações individuais não permitem a correta previsão do número de fetos (DOBSON *et al.*, 1993). O uso destas proteínas como diagnóstico de gestação pode ter seu valor comprometido devido ao fato de que estas glicoproteínas possuem um ritmo lento de desaparecimento no soro das vacas após o parto, tendo seus níveis mais elevados no parto e diminuindo rapidamente em torno dos 80 dias em vacas que não haviam concebido desde o parto anterior (KIRACOFÉ *et al.*, 1993). Humblot (1988) sugere que a detecção de PAGs seja um teste de prenhez adequado para aplicação 30 dias após o acasalamento, sendo útil em gado de corte e de leite.

Em um estudo realizado por Ricci (2015) foram comparados fatores associados com os níveis plasmáticos de PAGs no leite e no plasma e sua acurácia em relação ao diagnóstico precoce de gestação por ultrassonografia durante o primeiro terço da gestação de vacas da raça Holandesa. Foi constatado que a fase da gestação, a paridade, as perdas gestacionais e a produção de leite se relacionaram com os níveis de PAG tanto no leite quanto no plasma de forma semelhante. De acordo com o autor os níveis de PAG apresentam uma correlação negativa com a produção leiteira. Uma possível explicação para esta diminuição é que haja

uma menor produção de PAG pelo concepto, consequência de um menor crescimento e desenvolvimento embrionário durante o início da gestação devido a menores concentrações de progesterona, resultado de um aumento no metabolismo hepático relacionado ao aumento na produção de leite. Baseado nos perfis de PAG no plasma e no leite, amostras foram coletadas semanalmente, e com isso, foi sugerido que o momento ideal para realizar um primeiro diagnóstico de gestação é cerca de 32 dias após a IATF quando os níveis de PAG no plasma e leite estão iniciando seu pico. Embora as PAGs já sejam detectáveis em menores quantidades no leite ou no plasma aos 25 dias de gestação, em relação à ultrassonografia transretal apresenta a desvantagem de que caso ocorra perda gestacional, seus níveis se mantêm detectáveis por 7 a 14 dias após a perda, podendo gerar um diagnóstico falso positivo de prenhez.

Os testes citados anteriormente são vendidos nos Estados Unidos em kits. O teste de ELISA para leite custa U\$ 690,00, kit com 5 placas com um total de 480 poços, sendo U\$ 1,43 o custo individual de cada amostra. Já o kit para soro também com 5 placas e 480 poços custa U\$ 720,00 e U\$ 1,50 por amostra. No Brasil o custo total para realização dos testes no laboratório da APCBRH é de R\$ 16,00 por amostra até 45 amostras de leite, podendo ter um abatimento do valor para um número maior de amostras. Na Clínica do Leite os valores variam de R\$ 20,00 para até 5 amostras, até R\$ 14,00 para mais de 20 amostras.

#### **4.5 Ultrassonografia**

O ultrassom em tempo real (B-mode) tem sido usado no diagnóstico precoce de prenhez em rebanhos leiteiros desde meados da década de 1990. É um método rápido, preciso e considerado essencial economicamente para os produtores de leite que buscam uma melhora no desempenho reprodutivo do seu rebanho (DESCONTEAUX *et al.*, 1998; OLTENACU, 1990).

O ultrassom é um aparelho eletrônico que envia ondas de alta frequência e de baixa intensidade (ondas ultrassônicas) por meio de um dispositivo acoplado denominado transdutor. Estas ondas são emitidas através de cristais piezoelétricos situados no próprio transdutor. As ondas são refletidas para o transdutor, quando alcançam o feto e são convertidos para produzir uma imagem na tela do equipamento. Para o diagnóstico precoce de gestação em bovinos geralmente são utilizadas sondas lineares com frequências entre 5 e 8 MHz. Transdutores de baixa frequência são capazes de penetrar maiores profundidades de tecido, mas não são capazes de definir pequenas estruturas, já os de maior frequência são

capazes de definir estruturas menores, mas não penetram profundamente através dos tecidos. Quanto mais baixa for a frequência, maior é a penetração das ondas e maior a profundidade em que as imagens podem ser obtidas.

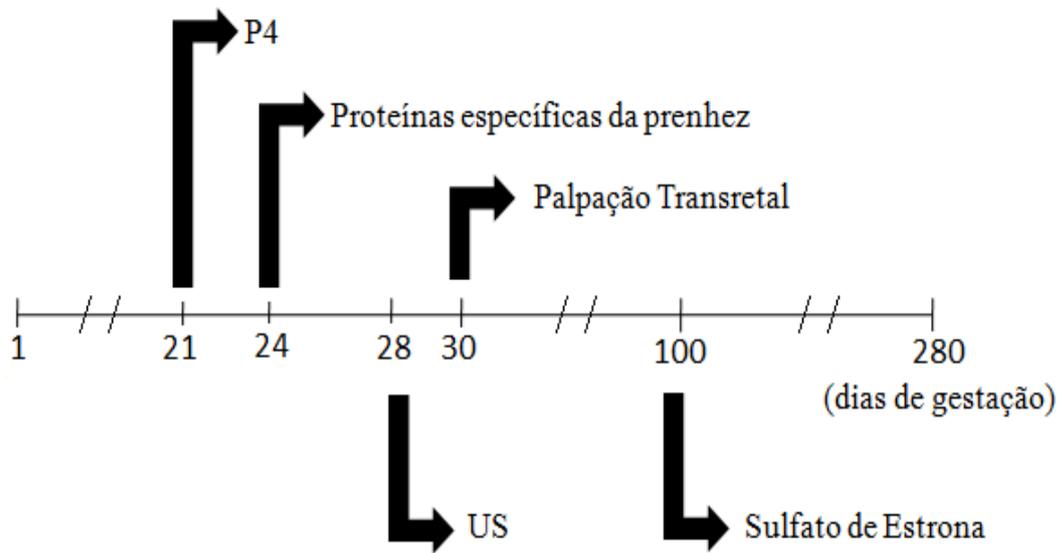
Várias alterações podem ser detectadas no conceito com o uso do ultrassom no início da gestação (BOYD, 1991). O líquido placentário começa a ocupar os cornos uterinos por volta do dia 17 após a cobertura e pode ser observado como uma área não-ecogênica (escura). Por volta do dia 19 o saco amniótico se expande consideravelmente e, assim, o lúmen do útero pode ser observado. Por volta do dia 22, é possível visualizar o batimento do coração embrionário e pelo dia 30 o conceito fica bastante evidente facilitando o diagnóstico. Por volta do 45º dia, as carúnculas uterinas podem ser visualizadas individualmente. Segundo Beal (1992) o sexo do feto pode ser identificado por volta do dia 55 com base na localização do tubérculo genital fetal.

A sexagem fetal por ultrassom em rebanhos leiteiros é bastante útil, pois possibilita que o produtor saiba próximo de 60 dias de gestação o sexo do terneiro resultante de uma transferência de embriões ou a inseminação de uma vaca de alto valor genético, por exemplo. A sexagem fetal também pode servir pra avaliar a precisão da sexagem dos espermatozoides, se utilizado sêmen sexado, sem ter que aguardar o nascimento do terneiro.

O uso da ultrassonografia em tempo real tem a vantagem de poder ser realizado relativamente cedo, na prática, cerca de 28 dias após a IA e também possibilita detectar problemas na gestação e observar as perdas iniciais. O custo de diagnóstico de gestação por ultrassonografia sofre influência do custo do próprio aparelho de ultrassom, riscos e manutenção do equipamento, podendo custar o dobro de um exame por palpação transretal. Exemplo: 2 kg de peso vivo da vaca ou simplesmente uma diária fixa independente do número de animais.

Fricke (2002) relatou que o ultrassom é um método rápido de diagnóstico de gestação ao qual veterinários com habilidade em palpação transretal se adaptam facilmente. A velocidade em que os exames de ultrassom podem ser realizados depende da eficiência do operador e da disponibilidade e contenção das vacas, mas que pode se aproximar de palpação retal (FRICKE, 2002).

Figura 4 - Esquema representativo com os períodos da gestação a partir dos quais cada técnica de diagnóstico de prenhez pode ser empregada.



Fonte: próprio autor.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O diagnóstico precoce de prenhez em vacas leiteiras é uma técnica fundamental na eficiência reprodutiva dos rebanhos. A possibilidade de identificar as vacas não gestantes o quanto antes permite ao produtor tomar decisões para minimizar suas perdas por este atraso na concepção, assim como descartar fêmeas improdutivas e implantar alterações de manejo como na detecção de estros.

Dentre os métodos disponíveis de diagnóstico precoce de prenhez alguns se sobressaem devido ao seu custo/benefício, sua não dependência de laboratórios para execução dos testes e sua disponibilidade no Brasil. A palpação transretal é a técnica mais comumente utilizada pelos médicos veterinários devido a sua praticidade e alta confiabilidade, dependendo apenas da habilidade de quem a executa, desconsiderando as variações individuais de cada animal que podem dificultar o exame. Embora seja uma técnica bastante eficiente, a palpação transretal para diagnóstico precoce requer sensibilidade e habilidade do examinador para que a prenhez seja detectada cedo (30 dias de gestação); assim, em comparação com outros métodos disponíveis, não é a maneira mais precoce de detectar prenhez.

O uso do ultrassom vem se tornando cada vez mais difundido entre médicos veterinários e é uma importante ferramenta de diagnóstico que possibilita diferenciar vacas prenhes de não gestantes mais cedo que a palpação transretal, permitindo a visualização de estruturas que não são possíveis de ser detectadas na palpação. Portanto, a associação destas duas técnicas proporciona bons resultados na detecção precoce de prenhez em rebanhos leiteiros, mitigando perdas de produção devido a atrasos na concepção.

Outras técnicas indiretas de detecção de prenhez também podem ser empregadas para obtenção de diagnósticos mais precoces, porém atualmente nem todas estão acessíveis no Brasil e é necessário levar em consideração a logística para a execução dos testes e os tempos entre a coleta e o resultado das análises, pois podem acabar não sendo vantajosos frente a outras técnicas mais difundidas.

O uso de provas como a dosagem de níveis de P4 e a detecção de bPAGs já é rotineiro em países como Estados Unidos e Reino Unido, com resultados satisfatórios e bom custo/benefício. No Brasil o uso destas técnicas ainda é pouco disseminado, mas futuramente podem vir a ser mais uma opção para se lançar mão como método de diagnóstico precoce de gestação para melhoria na eficiência reprodutiva dos rebanhos leiteiros brasileiros.

## REFERÊNCIAS

- ABBITT, B.; BALL, L.; KITTO, G. P. Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and fetal attrition in cows. **Journal of the American Veterinary Association**, Schaumburg, v. 173, n.8, p.973-977, nov.1978.
- ALEXANDER, B. N. *et al.* Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. **Theriogenology**, New York, v.43, n.3, p.551-556, feb.1995.
- BALL, L.; CARROLL, E. J. Induction of fetal death in cattle by manual rupture of the amniotic vesicle. **Journal of the American Veterinary Association**, Schaumburg, v.142, p. 373-374, feb.1963.
- BALLS, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reproduction in Cattle**. 3.ed. UK: Blackwell publishing, 2004. 242 p.
- BEAL, W. E.; PERRY, R. C.; CORAH, L. R. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, n.70, v.3, p. 924-929, mar. 1992.
- BOYD, J. S.; OMRAN, S. N.; Diagnostic ultrasonography of the bovine female reproductive tract. **In Practice**, v.13, n.3, p.109-118, may. 1991.
- BUTLER, J. E.; *et al.* Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. **Biology of Reproduction**, Madison, n. 26, v.5, p. 925-933, jun. 1982.
- BYREM, T. M.; VELEK, K.; PEARSE, H. L. **The Detection of Pregnancy Associated Glycoproteins (PAG) in Routine Milk Recording Samples as an Indicator of Pregnancy in Dairy Cattle**. Rome: International Committee for Animal Recording, [2012]. Disponível em: <[http://www.icar.org/cork\\_2012/Manuscripts/Published/Byrem.pdf](http://www.icar.org/cork_2012/Manuscripts/Published/Byrem.pdf)>. Acesso em: 15 abr.2015.
- CAVESTANY, D.; FOOTE, R.H. Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -induced estrus in open cows and presumed abortion in pregnant cows with unobserved estrus in a herd monitored by milk progesterone assay. **The Cornell Veterinarian**, New York, n. 75, v.3, p. 393-397, 1985.
- COWIE, A.T. Pregnancy diagnosis tests: A review. **Commonwealth Agricultural Bureaux Joint Publication**, n.13, p.11, 1949.
- Dairy Herd Improvement Association. **heat cycle detection: p4 rapid milk progesterone testing**. Manhein, ©2015. Disponível em: <<http://www.lancasterdhia.com/services/p4-rapid-milk-progesterone-heat-cycle-detection>>. Acesso em: 15 mar. 2015.
- DE VRIES, A.; BARTOLOME, J.; BROADDUS, B. What is Early Pregnancy Diagnosis Worth? In: FLORIDA DAIRY ROAD SHOW, 2., 2005, Florida. **Proceedings...** Florida: Florida Dairy Road Show, 2005. p.31-41, feb. 2005.
- DESCÔNTEUAX, L.; FETROW. Does it pay to use an ultrasound machine for early pregnancy diagnosis in dairy cows? ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN

ASSOCIATION OF BOVINE PRACTITIONERS, 1998, Spokane. **Proceedings...**Spokane: American Association of Bovine Practitioners, 1998. p.172 – 174.

DESCÔNTEUAX, L.; FETROW. Economic evaluation of the use of ultrasound in early pregnancy diagnosis in dairy cows: A decision analysis approach. ANNUAL CONVENTION OF THE CANADIAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION, 50., 1998, Toronto. **Proceedings...** Toronto: Canadian Veterinary Medical Association, 1998, p. 367 – 371.

DOBSON, H.; ROWAN, T. G.; KIPPAS, I. S. Assessment of fetal number, and fetal and placental viability throughout pregnancy in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 40, n.2, p.411-425, aug.1993.

ESSLEMONT, R. J. Relationship between herd calving to conception interval and culling rate for failure to conceive. **The Veterinary Record**, London, v.133, n. 7, p.163-164, aug.1993.

FRANCO, O. J.; DROST, M.; THATCHER, M. J. Fetal survival in the cow after pregnancy diagnosis by palpation per rectum. **Theriogenology**, New York, v. 27, n.4, p. 631-644, apr.1987.

FRICKE, P. M. Scanning the future – ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.85, n.8, p. 1918-1926, aug. 2002.

GORDON, I. **Controlled reproduction in cattle and buffaloes**. Londres: CAB International, 1996. 1v.

GOTTSCHALL, C. S. Indicadores de eficiência e manejo reprodutivo de bovinos de leite. Ciclo de palestras em produção e manejo de bovinos de leite,1., 1997, Canoas. **Ciclo...** Canoas: Ciclo de palestras em produção e manejo de bovinos de leite, 1997.

HANSEN, P.J., ARÉCHIGA, C.F. Strategies for managing reproduction in the heatstressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v .77, n.2, p. 36-50. 1999.

HEUWIESER, W. *et al.* Evaluation of different protocols for prostaglandin synchronization to improve reproductive performance in dairy herds with low estrus detection efficiency. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.80, n.11, p.2766-2774, nov. 1997.

HICKEY, G. J. Pregnancy diagnosis in dairy cattle: present status and future prospects. **The Cornell Veterinarian** , New York, v.80, n.40, p.299-302, oct. 1990.

HUMBLLOT, P., *et al.* Diagnosis of pregnancy by radio-immunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. **Theriogenology**, New York, v.30, n.2, p.257-267, aug.1988.

Idexx Laboratories. **Optimize reproductive efficiency with the IDEXX Milk Pregnancy Test**. Disponível em: <<https://www.idexx.com/dairy/tests/producers-reproduction.html>>. Acesso em: 15 mar. 2015.

- ITO, K., *et al.* Early pregnancy factor: EPF-like substance(s) purified from pregnant bovine ovary and *in vitro* fertilized ovum culture medium. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.41, n.1, p.85-92, jan. 1995.
- JOHNSON, M. S.; SENGER, P. L.; ALLEN, C. H. Fertility of bull semen packaged in 0.25- and 0.5-milliliter French straws. **Journal of Animal Science**; v.73, n.7, p.1914, 1995.
- KIRACOFÉ, G. H.; *et al.* Pregnancy-specific protein B in serum of postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.71, n.8, p.2199-2205, aug. 1993.
- KOURLETAKIBELIBASAKI, S.; STEFANAKIS, A., VAFIADIS, D. Reproduction management in dairy cattle: A prospective study using progesterone and estrone sulfate for monitoring pregnancy. **Animal Science**, Cambridge, v.60, n.2, p.177-183, apr. 1995.
- MORTON, H., *et al.* Early pregnancy factor has immunosuppressive and growth factor properties. **Reproduction, Fertility and Development**, East Melbourne, v.4, n. 4, p.411-422, 1992.
- NOAKES, D. Pregnancy diagnosis in cattle. **In Practice**, v.7, n.2, p.46-51, mar.1985.
- OLTENACU, P. A., FERGUSON, J. D.; LEDNOR, A. J. Economic evaluation of pregnancy diagnosis in dairy cattle: a decision analysis approach. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 10, p.2826-2831, oct. 1990.
- CLÍNICA DO LEITE ESALQ-USP. **P-CHECK - teste de prenhez no leite**. São Paulo: Clínica do Leite ESALQ-USP, [2014]. Disponível em: <[http://www.clinicadoleite.com.br/fazenda/B2BFazendasLocaweb/Inicio\\_files/FOLDER\\_V12.pdf](http://www.clinicadoleite.com.br/fazenda/B2BFazendasLocaweb/Inicio_files/FOLDER_V12.pdf)>. Acesso em: 01 jun. 2015.
- PAISLEY, L. G.; MICKELSEN, W. D.; FROST. A survey of the incidence of prenatal mortality in cattle following pregnancy diagnosis by rectal palpation. **Theriogenology**, New York, v.9, n. 6, :481-491, nov.1977.
- PRAKASH, B. S.; MADAN, M. L. Influence of gestation on oestrone sulphate concentration in milk of zebu and crossbred cows and murrha buffaloes. **Tropical Animal Health and Production**, Boston, v. 25, n. 2, p.94-100, may. 1993.
- RICCI, A., *et al.* Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effects on accuracy of pregnancy diagnosis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n.4, p.2504:2514, apr. 2015.
- ROBERTS, S. J. **Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology)**, 3.ed. Woodstock, 1986. 981 p.
- ROCHA, J. L., *et al.* Níveis de progesterona em leite desnatado de vacas no período pós-parto e diagnóstico precoce de gestação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.30, p.243- 47, 1993.

ROSENBAUM, A., L. D. WARNICK. Pregnancy diagnosis in dairy cows by palpation or ultrasound: a survey of US veterinarians. AABP ANNUAL MEETING, 7., 2004, Forth Worth. **Proceedings ...** Forth Worth: AABP, 2004. p.198.

SAKONJU, I., *et al.* Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy factor. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v.55, n. 2, p.271-274, apr.1993.

SASSER, R. G.; RUDER, C. A., IVANI, K. A. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. **Biology of Reproduction**, Madison, v.35, n. 4, p. 936-942, nov.1986.

SINCLAIR, K. D., *et al.* Pregnancy diagnosis using bovine pregnancy associated glycoprotein in purebred beef heifers mated at a first or second synchronized estrus. WINTER MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 1995. **Proceedings...** paper 139, 1995.

STEVENSON, J. S., CALL, E. P. Reproductive disorders in the periparturient dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.71, n. 9, p.2572-2583, sep.1988.

THOMPSON, J. A, *et al.* Evaluation of the benefits of the timing of pregnancy testing by transrectal palpation in dairy cattle. **Journal of the American Veterinary Association**, Schaumburg, v. 207, n.11, p.1462-1465, dec.1995.

THURMOND, M. C.; PICANSO, J. P. Fetal loss associated with palpation per rectum to diagnose pregnancy in cows. **Journal of the American Veterinary Association**, Schaumburg, v. 203, n. 3, p.432-435, aug.1993.

VAILLANCOURT, D., *et al.* Correlation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality. **Journal of the American Veterinary Association**, Schaumburg, v.175, n. 5, p.466-468, sept.1979.

WAHID, M. M., *et al.* Reproduction in native Egyptian cows: caruncles and placentomes. **Domestic Animal Reproduction**, v. 26, n. 1, p.42-46, feb.1991.

WHITE, M. E.; LAFANUCE, N.; MOHAMMED, .O. Optimal time postbreeding for pregnancy examination in dairy cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 30, n.2, p.147-149, feb.1989.

YOUNGQUIST, R.S.; THRELFEE, W.R.; **Current therapy in large animal theriogenology** 2. 2.ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 1997. 1061 p.

ZEMJANIS, R., FAHNING, M. L., SCHULTZ, R. H. Anestrus: The practitioner's dilemma. **Vet Scope**, Kalamazoo, v. 14, n. 1, p.15-21, 1969.