PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUB-CLÍNICA POST-PARTO EN TRES HATOS LECHEROS DE PUERTO RICO

Por

Amaris Guzmán Rivera

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En

INDUSTRIA PECUARIA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ

2014

Aprobada por:

_____ _____
Alexander Mesonero, DVM, M.S. Fecha
Miembro del Comité Graduado

_____ _____
Héctor L. Sánchez Rodríguez, Ph.D. Fecha
Miembro del Comité Graduado

_____ _____
Esbal Jiménez Cabán, PH.D. Fecha
Presidente del Comité Graduado

_____ _____
Alexandra Gregory Crespo, Ph.D. Fecha
Representante de Escuela Graduada

_____ _____
José R. Latorre Acevedo, Ph.D. Fecha
Director del Departamento

ABSTRACT

Reproductive efficiency in dairy herds is affected by environmental, genetic, management and health factors. Endometritis is one of the causes associated with low female reproductive efficiency. This study evaluated the prevalence of sub-clinical endometritis (**SE**) in three dairy herds in Puerto Rico. In cows averaging 45 ± 7 days post-partum, SE (defined as the presence of ≥5% of polymorphonuclear cells), was determined in two seasons (hot and cool) by endometrial cytology. The overall prevalence of ES (n = 101 cows) was 8.9% and it was not affected by breed (P = 0.73), season (P = 0.34), number of lactations (P = 0.60), nor the farm location (P = 0.56). For Holsteins (n=54), Brown Swiss (n=16), Jersey (n=22) and crossbreds (n=16) the prevalence of SE was 10.4, 18.7, 0 and 6.3%, respectively. Primiparous cows (n=43) showed a value of 7.1% and multiparous (n=65) was 10.2%. The prevalence of SE was 6.1% (n=55) during the hot versus 11.5% (n=53) during the cool season. As for location, in Moca, Lajas and Camuy showed value of 5.5, 6.6 and 12.0%, respectively. Compared to finding from other countries, the present results indicate a relatively low prevalence of SE in this sample of dairy herds in Puerto Rico.

RESUMEN

La eficiencia reproductiva en hatos lecheros se ve afectada por factores de ambiente, genética, manejo y salud. La endometritis es una de las causas asociadas con baja eficiencia reproductiva femenina. Esta investigación evaluó la prevalencia en promedio de endometritis sub-clínica (**ES**) en tres hatos lecheros de Puerto Rico. En vacas de 45±7 días post-parto, se diagnosticó por citología endometrial la ES (definiendo ésta como la presencia de ≥5% de células polimorfo nucleares), en dos épocas del año (calor y fresca). La prevalencia general de ES (n=101 vacas) fue 8.9% y no se afectó por la raza (P= 0.73), época (P=0.34), número de lactancias (P=0.60), ni por la localidad de la finca (P=0.56). Las vacas Holstein (n=54), Brown Swiss (n=16), Jersey (n=22) y cruces (n=16) registraron valores de ES de 10.4, 18.7, 0 y 6.3%, respectivamente. Vacas primíparas (n=43) mostraron un 7.1% de diagnosis positiva y las multíparas (n=65) de 10.2%. La prevalencia de ES fue de 6.1% en época de calor (n=55) versus 11.5% en época fresca (n=53). Las vaquerías ubicadas en Moca, Lajas y Camuy tuvieron valores de 5.5, 6.6 y 12.0%, respectivamente. En comparación a estudios en otros países, los resultados presentes demuestran una relativa baja tasa de ES en este muestreo de hatos lecheros de Puerto Rico.

DEDICATORIA

Este trabajo va dirigido a mis amados padres, Iván Guzmán y Nimia Rivera por su gran apoyo, dedicación, sacrificios, amor incondicional y gran ejemplo a seguir. Sin sus manos extendidas hacia mí en los momentos más difíciles de este camino no hubiera sido fácil alcanzar una meta más en la vida. Sus palabras de aliento me sirvieron de conforte y enseñanza para poder cruzar las adversidades y tropiezos encontrados en el sendero, por tal razón, mi ser y mi esfuerzo, se lo debo a ustedes, ¡gracias!

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, le agradezco a Dios por brindarme la sabiduría necesaria para llevar a cabo este recorrido, por escuchar mis plegarias, darme salud y vida para poder alcanzar cada meta propuesta. Agradezco el apoyo incondicional de mi consejero de maestría el Dr. Esbal Jiménez y miembros del comité graduado, Héctor Sánchez y Alexander Mesonero. También agradezco al Sr. Héctor Santana administrador de la Estación Experimental en Lajas, Pedro García, administrador de la vaquería en Moca y Rafy López, de la Vaquería El Remanzo por brindarme su ayuda, apoyo, tiempo y paciencia en el transcurso del proyecto. A mi novio, Jean Julbe por estar en las buenas y malas apoyándome incondicionalmente en todo el recorrido. También quiero agradecer a mis amigos de maestría que sin ellos todo hubiera sido más complicado y tedioso: Angélica Alvarado, Laura Morales, Karen Espino, Samuel Prieto, Dannamarie Acevedo y Natalia Rivera y a mis amigos profesores, Jaime Curbelo y Guillermo Ortiz. Agradezco a las secretarias a cargo del Departamento de Ciencia Animal, Sonia M. Miranda y Jacqueline Rivera por su tiempo y ayuda en documentos e información provista en el tiempo transcurrido en toda mi carrera como estudiantes de post grado. Gracias a mis hermanas Nimia I. Guzmán y Yari Guzmán por su apoyo y palabras de aliento, y a todos los que me han ayudado de alguna manera en lograr esta investigación.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Abreviatura	Significado
dpp	Días post- parto
DMI	Días en leche
EC	Endometritis Clínica
ES	Endometritis Sub- clínica
PMN	Polimorfo nucleares
CE	Citología Endometrial
IA	Inseminación Artificial
CL	Cuerpo Lúteo
NEFA	Ácidos Grasos No Esenciales
BHBA	Acido B- hidrocibutítico
CB	“Cytobrush”

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT **ii**

RESUMEN **iii**

DEDICATORIA **iv**

AGRADECIMIENTOS **v**

ABREVIATURAS **vi**

TABLA DE CONTENIDO **vii**

LISTA DE TABLAS **ix**

LISTA DE FIGURAS **x**

CAPITULO I **1**

INTRODUCCIÓN **1**

CAPITULO II **3**

REVISIÓN DE LITERATURA **3**

A. Situación Actual de la Industria Lechera en Puerto Rico **3**

B. Información General de Endometritis y Metritis **4**

C. Clasificación de Endometritis **5**

1. Endometritis clínica **5**

2. Endometritis sub-clínica **5**

D. Células Polimorfo nucleares **6**

1. Neutrófilos **6**

E. Patogenicidad **7**

F. Factores causantes de la deficiencia reproductiva en ganado lechero **9**

G. Balance Energético Negativo **10**

H. Síndrome de apareamiento continuo (Repeat Breeder Syndrome) **11**

I. Citología Endometrial **13**

1. "Cytobrush" **13**

J. Evaluación de Endometritis sub- clínica (tratamientos) **15**

CAPITULO III **17**

PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUB-CLÍNICA POST-PARTO EN TRES HATOS LECHEROS DE PUERTO RICO

INTRODUCCIÓN **17**

MATERIALES Y MÉTODOS **18**

A. Animales y Diseño Experimental **18**

B. Determinación de Endometritis Sub-Clínica- Colección de Muestras **19**

C. Citología **20**

D. Análisis Estadístico **22**

RESULTADOS **23**

DISCUSIÓN **29**

CAPITULO IV **34**

IMPLICACIÓN Y RECOMENDACIONES **31**

CAPITULO V **35**

REFERENCIAS **36**

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de números de vacas diagnosticadas por raza, época, lactancia y localidad con los correspondientes números de resultados positivos para endometritis sub-clínica. **24**

Tabla 2. Resumen de resultados de otras investigaciones publicadas sobre la tasa de frecuencia de endometritis sub-clínica durante el post-parto en bovinos de razas lecheras y de carne. **25**

Tabla 3. Prevalencia (media ± error estándar) de endometritis sub-clínica en vacas lecheras lactantes por raza. **26**

Tabla 4. Prevalencia (media ± error estándar) de endometritis sub-clínica en vacas lecheras lactantes por número de lactancia. **26**

Tabla 5. Prevalencia (media ± error estándar) de endometritis sub-clínica en vacas lecheras lactantes por época. **26**

Tabla 6. Prevalencia (media ± error estándar) de endometritis sub-clínica en vacas lecheras lactantes por localidad. **26**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografías de los instrumentos utilizado en el estudio para realizar la citología endometrial. A) Cepillo utilizado para colectar las muestras. B) Protector plástico para la varilla de inseminar. C) Varilla de inseminar armada con el cepillo y el protector plástico que lo recubre. **20**

Figura 2: Fotografías de los productos utilizados para la tinción y fijación de las células. A) Tinte "Dip Quick Stain" #1 (Counter Stain) y #2 (Stain Solution). B) Cito Fijador de células (Fixative). C) Computador y microscopio utilizado para la observación y conteo de las células epiteliales y las células polimorfo nucleadas. **21**

Figura 3: Imágenes observadas bajo microscopio de las diferentes células polimorfo nucleadas. A) Neutrófilos B) Macrófagos **22**

Figura 4: Porcentaje de vacas con endometritis sub-clínica. **27**

Figura 5: Porcentaje de vacas que presentan endometritis sub-clínica por raza. **27**

Figura 6: Porcentaje de vacas que presentan endometritis sub- clínica por lactancia. **28**

Figura 7: Porcentaje de vacas que presentan endometritis sub- clínica por época. **28**

Figura 8: Porcentaje de vacas que presentan endometritis sub- clínica por localidad. **29**

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La reproducción en ganado de leche es de una importancia crítica cuando se trata de la producción de leche y productos derivados. La industria lechera de Puerto Rico es la principal fuente de ingreso y empleo agrícola, por ende, para poder producir efectivamente se debe mantener un balance entre los tres requerimientos necesarios que tiene un animal: mantenimiento, reproducción y producción. Sobre todo, es importante maximizar la eficiencia reproductiva con el objetivo de mejorar la producción general en los hatos lecheros para reducir los costos por cuartillos de leche. Algunas variables que pueden influenciar en la eficiencia reproductiva de vacas lecheras son: el intervalo entre partos, el número de días abiertos (Melcher *et al*., 2014) y alimentación de las vacas en periodo de baja productividad, gastos en semen y servicios profesionales adicionales (Schaab *et al*., 2010). En cuanto a endometritis, se ve afectado por la influencia en la adquisición de patógenos en el periodo post-parto del animal. Podemos encontrar patógenos como las bacterias A. *pyogenes* y E. *coli* que son causantes de infecciones uterinas y por ende de una inflamación a nivel uterino en el periodo post-parto. Lograr mejorar la producción general en hatos lecheros, conlleva un mantenimiento de las facilidades, instalaciones y un buen trato hacia los animales. En ocasiones, el hato lechero no posee el desempeño reproductivo deseado y esto se debe, generalmente, a las fallas en la detección de celo, factores nutricionales, medioambiente e infecciones, resultando en consecuencias monetarias sustanciales (Schaab *et al*., 2010).

Entre el ganado vacuno, podemos encontrar múltiples enfermedades que causa desbalance a nivel reproductivo. Entre estos patógenos se encuentran los que invaden el tracto reproductivo femenino del animal, causando infecciones microbianas y por ende

inflamación del área de insulto. A consecuencia de la invasión patogénica, esto puede causar infecundidad o sub-fecundidad al animal por medio de la interrupción de la función ovárica (Schaab *et al*., 2010).

La invasión de patógenos en la cavidad uterina en los primeros días post-parto puede causar enfermedades como metritis y endometritis. Ambos tipos de enfermedad afectan negativamente el desempeño reproductivo, incluyendo un incremento en los días al primer servicio (Kasimanickam *et al*., 2004; Hammon *et al*., 2006; Plontzke *et al*., 2010), disminución de la tasa de concepción (Kasimanickam *et al*., 2004; Hammon *et al*., 2006; Salasel *et al*., 2010), reducción en la tasa de preñez (Sheldon *et al*., 2009a; Hammon *et al*., 2006; Salasel *et al*., 2010) y por consiguiente, aumento en descartes (Hammon *et al*., 2006; LeBlanc, 2007; Plontzke *et al*., 2010). Dependiendo de la gravedad de la infección la endometritis se clasifica en clínica o sub-clínica, siendo esta última muy frecuente en vacas lecheras (Sheldon *et al*., 2009a). Sheldon *et al* (2009a) encontraron que en un hato de vacas lecheras el 40% de los animales sufrían metritis, un 15-20% endometritis clínica y > 30% endometritis sub-clínica. Investigadores han encontrado que, infecciones uterinas post-parto están relacionadas con una reducción en la eficiencia reproductiva y el potencial en el hato lechero (Lewis, 1996) por lo que afecta las ganancias de la empresa. Por consiguiente, las infecciones uterinas afectan considerablemente la etapa reproductiva de los animales, influyendo en la productividad del animal y en la empresa ganadera.

Las vacas en los hatos lecheros de Puerto Rico se enfrentan a un gran desafío durante el post-parto porque es una etapa que incrementan los requerimientos nutricionales, ocurre un aumento progresivo en la producción láctea hasta llegar al pico de lactancia y la involución uterina (LeBlanc, 2007), el retorno a la ciclicidad (Santos *et al*., 2009) y posiblemente el

establecimiento de una nueva gestación (LeBlanc, 2007; Santos *et al*., 2009). El diagnóstico correcto y temprano de ciertas patologías uterinas permite actuar a tiempo y mantener la eficiencia reproductiva del ganado.

Según, Kasimanickam *et al* (2004), la mayoría de las vaquerías presentan una deficiencia en el manejo reproductivo del animal; lo cual podría aumentar la probabilidad de la incidencia en las infecciones uterinas en vacas lecheras y por consecuencia, bajo rendimiento productivo del hato lechero reduciendo el rendimiento por vaquería. Algunos de los aspectos que afectan la calidad reproductora del animal son, problemas al parto e infecciones uterinas padecidas en gestaciones anteriores, que provocan una reducción significativa en la eficiencia reproductiva de vacas altas productoras. Por ende, en la presente investigación se analizará la prevalencia de endometritis sub-clínica en tres hatos lecheros de Puerto Rico.

CAPÍTULO II

REVICIÓN DE LITERATURA

A. Situación Actual de la Industria Lechera en Puerto Rico

En Puerto Rico, la industria lechera es la principal empresa agrícola; para el año fiscal 2010-2011, el valor del Ingreso Bruto Agrícola ascendió a 789.8 millones de dólares de los cuales 235.1 millones corresponden a la producción de leche, lo que constituye un 29.8% del total (Oficina de la Reglamentación de la Industria Lechera, ORIL, 2010- 2011). La industria lechera es afectada por varios factores, entre estas, la baja eficiencia reproductiva, afectando así la fase productiva y económica. Por otro lado, la presencia de enfermedades en los hatos lechero en Puerto Rico. Entre las enfermedades reproductivas que afectan al ganado lechero en Puerto Rico se encuentra la endometritis y la metritis. Las pérdidas económicas asociadas

a la endometritis en Estados Unidos se estiman en alrededor de $285 por lactación (Kasimanickam *et al*., 2004). Estas pérdidas se relacionan a la disminución en tasas reproductivas, aumento en los días abiertos, los tratamientos a animales afectados y el aumento en el requisito de vacas de reemplazo (Melcher *et al*., 2014). Sheldon *et al*. (2009a) indicaron que un 20-40% de los animales desarrollan enfermedades uterinas como metritis en la primera semana post-parto, un 20% mantienen las enfermedades uterinas alrededor de las 3 semanas después del parto (endometritis) y aproximadamente un 30% padecen de endometritis sub-clínica. Por otra parte, Salasel *et al*. (2010) indicaron que alrededor de las primeras dos semanas después del parto un 40% de los animales padecen de metritis, un 10-15% mantienen enfermedades crónicas uterinas como la endometritis y un 30-35% de los animales poseen entre las 4 a 9 semanas después del parto endometritis sub-clínica. Para obtener un diagnóstico sobre endometritis sub-clínica es necesario realizar pruebas histológicas por medio de biopsias o por la técnica de "cytobrush" (**CB**) (Westermann *et al*., 2010).

B. Información General de Endometritis y Metritis

La endometritis y metritis son identificadas como enfermedades uterinas que poseen una alta prevalencia en el hato lechero (Galvão *et al*., 2009). Según el estudio realizado por LeBlank *et al*. (2002), los términos metritis y endometritis se han utilizado de la misma forma, sin tener a menudo una definición categórica de cada enfermedad uterina y sin identificar el caso clínico particular de la enfermedad. Por consiguiente, se definió posteriormente los trastornos uterinos post-parto, como la metritis que se presenta a través de signos clínicos en el 21 días post-parto (**dpp**) (Sheldon *et al*., 2006; LeBlank, 2007; Westermann *et al*., 2010) y que esta no solo afecta el endometrio, sino a todas las capas que forman la pared uterina (Sheldon *et al*., 2006). Alguno de los síntomas relacionados a la

metritis son: fiebre, descargas uterinas, ritmo cardiaco elevado y baja producción de leche entre otras (LeBlank, 2007; Sheldon *et al*., 2006). Por otro lado, la endometritis se presentan a partir de los 21 dpp y afecta solo el endometrio (Dubuc *et al*, 2010). La endometritis se caracteriza por una alteración de la superficie del epitelio, esto provoca la entrada de células inflamatorias como linfocitos y células del plasma en las capas superficiales (Meira *et al*., 2012; LeBlank, 2007).

C. Clasificación de Endometritis

La endometritis se clasifica en clínica (**EC**) y sub-clínica (**ES**); sólo en el primer caso el animal muestra signos de alteraciones uterinas (Dominguez *et al*., 2006; Sheldon *et al*., 2006).

1. Endometritis clínica

La EC se caracterizada por presentar descarga genital purulenta luego de los 21 dpp o por presencia de descargas muco-purulenta después de 26 dpp (Meira *et al*., 2012; Dubuc *et al*., 2010). Estas descargas se asocian con infecciones bacterianas crónicas del útero a treves del carácter del moco y el olor del mucus vaginal, se utiliza fácilmente para evaluar las vacas con endometritis clínica (Sheldon *et al*., 2009b). Como evidencia, Sheldon, *et al*. (2009b) encontró que la incidencia de la endometritis clínica es aproximadamente del 10-20% en el ganado lechero.

2. Endometritis Sub-Clínica

La ES no presenta signos clínicos y más importante aún, solo es detectada por la presencia y el porcentaje de células polimorfo nucleadas (**PMN**), a través de la citología endometrial (**CE**) (Sheldon *et al*., 2002; Meira *et al*., 2012; Galvao *et al*., 2009; Dubuc *et al*., 2010). En estudios de Sheldon *et al*. (2009b) y Dubuc *et al*. (2010) la presencia de endometritis sub-clínica existe en un número ≥18% de neutrófilos para los 20-33 dpp y un número ≥10% para

los 34-47 dpp (Sheldon *et al*., 2009b), ≥6% a ≥8% para los 28-41 y ≥4% a ≥5% en los 40-60 dpp (Dubuc *et al*., 2010), presentes en muestras obtenidas de la CE (Sheldon *et al*., 2009b; Dubuc *et al*., 2010).

La ES generalmente no es diagnosticada, debido a que no presenta ningún signo clínico y puede estar presente en vacas aparentemente sanas. Por lo tanto, vacas que no muestran ningún signo de trastorno reproductivo pueden igualmente estar padeciendo de ES. Como consecuencia de esto, la fecundidad se ve afectada al finalizar el periodo de espera voluntario (Melcher *et al*., 2014). En estudios realizados, se ha encontrado que la incidencia de endometritis sub-clínica varía entre el 37- 74% de los animales (Sheldon *et al*., 2009b) y sus tasas de concepción son aproximadamente un 20% menor para vacas con endometritis (Sheldon *et al*., 2009b).

D. Células Polimorfo nucleares

En adición, las enfermedades uterinas, como endometritis clínica y sub-clínica se caracteriza por la proliferación cada vez mayor de los leucocitos polimorfo nucleares (PMN) en la citología uterina. Estos son un tipo de glóbulo blanco que se produce en la medula ósea y circulan en la sangre y tejidos. Una de sus clasificaciones son los neutrófilos y estos abarcan el 50- 70% de todos los glóbulos blancos de la sangre.

1. Neutrófilos

Estas células componen la primera línea de defensa contra organismos patógenos (Kasimanickam *et al*., 2004) que invaden el tracto reproductivo femenino en el periodo post-parto. Estas células son reclutadas desde la circulación periférica hacia la cavidad uterina para fagocitar a las bacterias. Esto resulta en un incremento de la población de PMN dentro del lumen uterino (Kasimanickam *et al*., 2004). Sin embargo, la capacidad funcional de los PMN se encuentra reducida en el post-parto de muchas vacas (Sheldon *et al*., 2009b; Galvao

et al., 2010). Esta disminución puede favorecer y predisponer al establecimiento de infecciones uterinas tanto clínicas como sub-clínicas (Sheldon *et al*., 2009b). Por consiguiente, un método utilizado para la detección de endometritis sub-clínica es un examen citológico, debido a que el animal no presenta signos clínicos de alguna patología uterina (Salasel *et al*., 2010; Sheldon *et al*., 2006).

Estas enfermedades tiene un efecto perjudicial importante sobre la fecundidad de las vacas lecheras (Galvão *et al*., 2009) porque animales diagnosticados en etapa temprana con retención de placenta y metritis en el periodo post-parto tienen el doble de probabilidades de desarrollar endometritis sub-clínica después de 30 dpp.

E. Patogenicidad

El útero permanece estéril durante la preñez, sin embargo durante y luego del parto, microorganismos del medio ambiente pueden ganar acceso a la cavidad uterina de la vaca (Sheldon *et al*., 2009a). La patogenicidad de microorganismos causantes de infecciones uterinas dependerá de su capacidad en adherirse a la mucosa del útero, colonizar el epitelio y de mecanismos de producción de toxinas (Sheldon *et al*., 2009a; Foldi *et al*., 2006). Por lo tanto, existe un equilibrio entre la inmunidad del huésped y la parte infecciosa del patógeno para poder desarrollar enfermedades clínicas que afectan al ganado lechero (Sheldon *et al*., 2009a). Este equilibrio puede favorecer el desarrollo de la enfermedad debido a factores de riesgo como: placenta retenida, distocia, mellizos y/o muerte fetal (Sheldon *et al*., 2009a), las cuales son algunas de las causas más importantes de la disminución en el rendimiento reproductivo de vacas lecheras.

Durante el periodo post-parto temprano más del 90% de las vacas son predispuestas a adquirir múltiples bacterias en la cavidad uterina, sin observar signos clínicos de la

enfermedad (Kasimanickam *et al*., 2004; Westermann *et al*., 2010). A su vez se observa que la prevalencia de la infección decrece en este tiempo. Es común que haya una disminución en el número de bacterias y en la variedad de especies alrededor de las 3 a 4 semanas post-parto (LeBlank, 2008; Westermann *et al*., 2010).

Las infecciones uterinas desarrolladas durante los primeros 10-14 dpp que presentan signos clínicos a menudo se asocia con Arcanobacterium *pyogenes*, Escherichia *coli*, Fusobacterium *necrophorum* y Prevotella *melaninogenicus*, (Sheldon *et al*., 2009b; Sheldon *et al*., 2009a; LeBlank *et al*., 2008). En el estudio de Foldi *et al*. (2006) se menciona que en el día 10 luego del parto, las principales bacterias aisladas del útero de vacas con metritis sub-clínica son: Streptococcus spp, Staphylococcus spp y Bacillus spp. Investigaciones como las de Sheldon *et al*. (2009a) y Sheldon *et al*. (2009b), indican que en las infecciones uterinas en la primera semana post-parto la bacteria que se aísla en la cavidad uterina es E. *coli*, mientras en la segunda semana se aísla a A. *pyogenes*. Esta última, está asociada a una subsecuente endometritis (LeBlanc, 2008; Westermann *et al*., 2010). La presencia de A. *pyogenes* en el útero luego de las tres semanas post-parto causa descarga vaginal purulenta, infección persistente y aumento de la inflamación del endometrio. Mientras que a los 28-35 dpp se asocia a un descenso en la tasa de concepción (Foldi *et al*., 2006). Estas infecciones provocan un retraso de la involución uterina y daños a los embriones (Melcher *et al*., 2014) lo que causaría infecundidad y por ende una disminución en el rendimiento productivo del animal (LeBlank, 2008).

Sheldon *et al*. (2009a), reporta que lesiones endometriales mas graves son causadas por A. *pyogenes*, y que esta expresa varios genes de virulencia, por ejemplo, el gen *plo* (pyolysin). Pyolysin (OLP), es una exotoxina hemolítica expresada por Arcanobacterium

(Actinomyces) pyogenes, ésta es miembro del tiol activado por la familia citosilina de toxinas bacterianas. Este gen codifica una pyolysin citotoxina dependiente de colesterol. La unión de moléculas pyolysin con el colesterol en las membranas celulares conduce a la muerte osmótica de la célula. Los OLP también mata rápidamente las células del endometrio in vitro (Sheldon *et al*., 2009a; Sheldon *et al*., 2009b). Por otro lado, E. *coli* produce toxinas bacterianas como la endotoxina y lipopolisacárido (LPS) (Sheldon *et al*., 2009b). Tenemos que, F. *necrophorum* produce una leucotoxina, P. *melaninogenicus* produce una sustancia que inhibe la fagocitosis y A. *pyogenes* produce un factor de crecimiento para F. *necrophorum* (Sheldon *et al*., 2009a; Sheldon *et al*., 2009b). Estos estudios han determinado que el trauma a los tejidos durante el parto facilita la adhesión y la invasión de los patógenos en la cavidad uterina (Sheldon *et al*., 2009a).

F. Factores causantes de la deficiencia reproductiva en ganado lechero

Investigadores han encontrado que bajo cualquier sistema de producción en ganado vacuno, la EC y la ES afectan la eficiencia reproductiva de las hembras al aumentar los intervalos entre el parto al primer servicio (Kasimanickam *et al*., 2004; Melcher *et al*., 2014), intervalo parto-concepción e intervalo parto-parto (Plöntzke *et al*., 2010) así como también, la cantidad de servicios necesarios por preñez (Kasimanickam *et al*., 2004; Plöntzke *et al*., 2010; Madoz *et al*., 2013). Las infecciones uterinas son capaces de causar retraso en la involución uterina, lesiones histológicas del endometrio, respuesta inflamatoria severa y pueden afectar la supervivencia de los embriones (Melcher *et al*., 2014). Estos factores están asociados a una disminución en la tasa de preñez cuando se realiza la inseminación artificial (**IA**), también puede ocurrir intervalos extensivos de preñez (Galvao *et al*., 2009a), retraso del inicio en la actividad ovárica cíclica post-parto, se extiende la fase lútea, ocurre reducción

en la tasa de concepción y por consecuencia ocurre un aumento en los descartes (Melcher *et al*., 2014). Todos estos factores pueden causar infecundidad o sub-infecundidad, provocando pérdidas económicas sustanciales (Kasimanickam *et al*., 2004).

G. Balance Energético Negativo

La salud del útero ha demostrado influir en el rendimiento reproductivo y productivo de la vaca durante el periodo post-parto (Kasimanickama *et al*., 2004). Durante la transición a la lactancia, se ven afectados los requerimientos fisiológicos del animal, como lo es el mantenimiento, reproducción y producción de leche (Galvão *et al*., 2010). Esto se debe a que la vaca se expone a un periodo de balance energético negativo, en el cual, la energía consumida por ésta no satisface las demandas de energías (Galvão *et al*., 2010). El periodo de balance energético negativo se caracteriza, según Galvão *et al*. (2010), por una disminución en los días en lactancia y una reducción en la función de las células PMN. La disminución en los días en lactancia, se asocia con la movilización de lípidos, que son liberados como ácidos grasos no esterificados (**NEFA**) desde el tejido adiposo (Hammon *et al*., 2006). Esto ocurre por la movilización de la grasa corporal en forma NEFA lo cual resulta en la acumulación de productos de la oxidación incompleta de NEFA una vez ocurre una disminución de glucosa (Galvão *et al*., 2010). Un aumento en los niveles de NEFA y del ácido B-hidrocibutírico (**BHBA**) se asoció con la supresión de la función inmune, contribuyendo al deterioro del sistema inmune en vacas lecheras y predisponiéndolas a adquirir endometritis (Hammon *et al*., 2006). Hammon *et al*. (2006) informa que la exposición de las células PMN a niveles altos de BHBA reduce este tipo de células provocando una mayor susceptibilidad a adquirir infecciones locales y sistémicas durante el periodo post-parto. Además de la asociación de la función de los PMN con los niveles de NEFA y BHBA, estas células dependen principalmente de la captación de glucosa y

glucólisis para proveer la energía necesaria para la quimiotaxis de las células PMN (Hammon *et al*., 2006; Galvão *et al*., 2010). Existe la posibilidad de que los niveles bajos de glucosa en la sangre durante la transición a la lactancia tendría un efecto directo en la quimiotaxis de estas células (Galvão *et al*., 2010), disminuyendo las células PMN y las reservas de glucógeno, reduciendo así la capacidad fagocítica de las células PMN en el tejido embrionario y uterino. Este mecanismo predispone al animal a desarrollar infección uterina (Galvão *et al*., 2010). Hammon *et al*. (2006) encontró que la función de las células PMN declina antes del parto y retorna lentamente luego de 4 semanas post-parto.

H. Síndrome de apareamiento continuo, "Repeat Breeder Syndrome"

El síndrome de apareamiento continuo ocurre cuando la vaca está completando un ciclo normal, sin alteraciones clínicas, pero a su vez, no ha podido concebir después de por lo menos dos inseminaciones sucesivas (http://www.thecattlesite.com). Por ende, es importante determinar la prevalencia y factores de riesgos y el impacto que tienen la EC y ES en vacas lecheras altas productoras. Según estudios previos de Salasel *et al*. (2010), el síndrome de apareamiento continuo (*Repeat Breeder Syndrome)* es el mayor problema que afecta la eficiencia reproductiva y su incidencia en Estados Unidos es del 10.1- 24% en hatos lecheros. El rendimiento reproductivo se ve afectado por este síndrome, causando a su vez pérdidas económicas sustanciales de alrededor de $285 por lactación. Este síndrome contribuye a aumentar los intervalos a concepción, se incurre en altos costos de IA, aumentan descartes involuntarios (Melcher *et al*., 2014), costos de reemplazos, ocurre una pérdida en el progreso genético y reducción en la fecundidad del animal (Salasel *et al*., 2010). Por otro lado, existen varios factores asociados con este síndrome, algunos de estos factores son: desarrollo embrionario deteriorado, anomalías pre-ovulatorias, daño al endometrio (Melcher *et al*., 2014), estrés, concentraciones inadecuadas de progesterona post-ovulatoria, quistes ováricos

inoportunos, niveles de progesterona sub-lútea y disfunción lútea o defectos de ovulación (Salasel *et al*., 2010). La presencia de la ES, es uno de los factores etiológicos del síndrome y se ha encontrado en estudios previos que la prevalencia general de ES varía por estudio entre un 12 a 94%. En el estudio de Kasimanickam *et al*. (2004) la prevalencia de ES es de 51% y 41% para la visita 1 y visita 2 respectivamente; Gilbert *et al*., (2005) reportaron una prevalencia general de ES de 53%; la prevalencia de ES en el estudio de Hammon *et al*., (2006) fue de 51.8% y según Barlund *et al*., (2008) es de 11.1%. El estudio de Gilbert *et al*. (2005), por ejemplo, reporta el porcentaje de preñez al primer servicio en vacas con ES en un 11% vs vacas sin ES con un 36%.

Distocia, retención de placenta, parto de gemelos, abortos e infecciones uterinas después del parto como metritis, piometria y endometritis, son algunas de las causas más importantes en la disminución de la capacidad reproductiva en vacas lecheras (Galvao *et al*., 2009b; Sheldon *et al*., 2009a). En el estudio de Galvao *et al*. (2009b) realizado con vacas Holstein (n= 812) en el estado de California, se encontró que vacas que padecieron de metritis o piometria redujeron su eficiencia reproductiva de la vaca. Además, encontró que vacas lecheras con metritis y retención de placenta aumentaron la incidencia de ES. Investigaciones previas, han determinado que alrededor del 40% de las vacas padecen de metritis en las dos primeras semanas luego del parto (Salasel *et al*., 2010) y que en el 10 – 15% de estos animales la infección persiste durante al menos otras tres semanas causando así una endometritis crónica (Salasel *et al*., 2010). En estudios más recientes, alrededor del 30-35% de las vacas poseen ES entre la cuarta y novena semana post-parto (Salasel *et al*., 2010). En el estudio de Salasel *et al*. (2010) realizado en Irán con vacas Holstein (n=77), se encontró que un 31% (n=24) tenían un historial de infecciones uterinas post-parto y un 69% (n=53) no

padecieron previamente de infecciones uterinas. Por otro lado, encontró que para el último parto un 70% (n=54) de las vacas seleccionadas tuvieron un parto normal versus un 30% (n= 23) que fueron partos anormales (distocia, gemelos, aborto). También encontraron que, un 9% (n=7) tuvieron retención de placenta, provocando una incidencia de infecciones uterinas post-parto. Salasel *et al*. (2010) determinaron que, factores de riesgos como distocia y retención de placenta pueden provocar infecciones crónicas en el útero. Además, partos anormales junto con infecciones uterinas están asociadas al incremento en la prevalencia de ES para los días 190±40 post-parto. Para el estudio realizado por Salasel *et al*. (2010), no se encontró que la ES tuviera un efecto negativo en la eficiencia reproductiva, mientras que la tasa de concepción para la primera IA fue de 5% para vacas con ES y 47% para vacas sin ES .

I. Citología Endometrial

La citología endometrial es una práctica implementada recientemente para la evaluación de la salud uterina en bovinos (Gilbert *et al*., 1998; Ruiz y Sandoval, 2013). Esta se caracteriza por ser rápida, específica, sensible y económica, lo que la hace una herramienta valiosa para la investigación sobre el impacto de la endometritis en el ganado (Gilbert *et al*., 2005; Cocchia *et al*., 2012). Las muestras para citología pueden ser tomadas principalmente por medio de dos técnicas: 1- lavado uterino (Gilbert *et al*., 1998, 2005) y 2- "Cytobrush" (CB) (Kasimanickam *et al*., 2004, 2005; Cocchia *et al*., 2012; Melcher *et al*., 2014). También se han citado, como posibles técnicas para el diagnóstico de ES, la biopsia, hisopado (Barlund *et al*., 2008) y la ultrasonografía (Barlund *et al*., 2008; Kasimanickam *et al*., 2004). Sin embargo los primeros métodos se utilizan más debido a su bajo costo, rápido y su fácil manejo, además se puede obtener un mayor número de muestras. En todos los casos, las

muestras se obtienen de animales que fueron previamente diagnosticados como negativos a EC. Estudios de Salasel *et al*. (2010) reportan que la endometritis sub-clínica diagnosticada por citología endometrial se asocia con una reducción sustancial de la tasa de preñez en un 20% (LeBlanc, 2008).

1. "Cytobrush"

Ésta técnica se basa en la obtención de células a partir del endometrio, mediante un cepillado de la superficie interna del útero. Cocchia *et al*. (2012) recomiendan la utilización de las técnicas del CB y lavado uterino debido a que es un método poco invasivo dentro del organismo. Investigadores optan por la utilización del CB debido a que es un método más confiable porque preserva mejor las muestras, se obtiene mayor muestra del contenido luminar y no genera alteración celular como sucede con el lavado uterino (Kasimanickam *et al*., 2005; Cocchia *et al*., 2012). En la técnica del lavado uterino a pesar de que se obtiene una muestra representativa del área, causa irritación de la mucosa y puede causar infección o lesiones uterinas como traumas debido a la manipulación del útero (Cocchia *et al*., 2012). Otra desventaja del lavado uterino es que conlleva una subsecuente centrifugación de la suspensión celular y mayor instrumentación comparado con otras técnicas (Cocchia *et al*., 2012). En el estudio de Cocchia *et al*. (2012), se encontró que la proporción de células PMN/células uterinas para la detección de endometritis en la técnica de lavado uterino fue del 75% (15/20) mientras que para la técnica del CB fue de 25% (5/20).

A través de las diferentes técnicas de la citología endometrial, se obtienen las células PMN, las cuales actúan en el área de inflamación, causando la eliminación de la infección por medio de su capacidad fagocítica (Melcher *et al*., 2014). El porcentaje de células PMN se determina mediante la evaluación de estas sobre el número de células totales. Por ejemplo, en el estudio de Kasimanickam *et al*. (2005), se reporta que ≥18% de células PMN en los

días 20-33 post-parto y ≥10% en los 34-47 dpp se diagnostica con ES, mientras que Gilbert *et al*. (2005) reporta que ≥5% de células PMN en los días 40-60 post-parto. Este porcentaje es indicativo de la presencia de inflamación en el endometrio, y se encuentra correlacionado inversamente con los días en lactancia del animal. Por consiguiente, hay una disminución en el número de PMN a medida que se aproxima la recuperación histológica del útero (Kasimanickam *et al*., 2005).

J. Evaluación de Endometritis sub-clínica (tratamientos)

El objetivo del manejo reproductivo en hatos lecheros es obtener vacas preñadas, preferiblemente en coordinación con condiciones ambientales favorables (Periodo del año fresco). Es importante mantener un intervalo entre partos económicamente rentable, por ende es importante el examen de un veterinario. Este debe permitir el proceso normal de la involución, pero a la vez proporcionar tiempo suficiente para el tratamiento y el inicio del periodo de cría (Sheldon *et al*., 2006). Al encontrarse una alta prevalencia de enfermedades uterinas en hatos lecheros, el impacto de esta enfermedad merece consideración y un buen manejo en la prevención de enfermedades uterinas. La cuantificación de la prevalencia de la enfermedad ayudaría a detectar y poner en marcha diagnósticos secundarios o medidas alternas para la detección de endometritis sub-clínica mejorando así la evaluación del tratamiento (LeBlanc, 2008). Por lo tanto**,** son utilizados los tratamientos contra enfermedades uterinas para ayudar a revertir y/o eliminar los cambios inflamatorios que perjudican la fecundidad del animal, mientras se mejora la defensa uterina y su reparación es completada.

Para mejorar la eficiencia reproductiva en el ganado lechero se pueden llevar a cabo diferentes tratamientos. Uno recomendado por varios investigadores, es el tratamiento con la

hormona prostaglandina$F_2\alpha$ (**$PGF_2\alpha$**) y la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) (Kasimanickam *et al*., 2006). En estudios previos por Galvão *et al*. (2009a) y Kasimanickam *et al*. (2006), se ha evaluado el efecto de la administración de estas hormonas sobre la prevalencia de la ES y la fecundidad en vacas lecheras. El beneficio de la administración de $PGF_2\alpha$ se cree proviene del rompimiento del cuerpo lúteo (**CL**) seguido de una subsecuente inducción del estro en vacas lecheras por la GnRH. El estro provoca la expulsión de patógenos bacterianos y productos inflamatorios, provocando así, una posible mejora en la defensa del útero (Kasimanickam *et al*., 2005). Por tal razón, investigaciones previas concluyen que la incidencia de endometritis se reduce en las vacas tratadas con dosis de $PGF_2\alpha$ en los 21- 49 días en leche (Kasimanickam *et al*., 2006). En estudios relacionados a la detección de endometritis sub-clínica, Kasimanickam *et al*. (2006) han determinado diferentes técnicas de diagnóstico para la enfermedad tales como; palpación uterina transrectal, vaginoscopía, biopsia uterina, cultivo de fluidos uterinos y citología uterina. Todas estas técnicas varían de acuerdo al tiempo post-parto en que son colectadas las muestras, por ende, esto contribuye a las opciones provistas para cada tratamiento. Otro posible tratamiento indicado por Sheldon *et al*. (2009a) es la utilización de probióticos, debido a la presencia de estafilococos coagulasa-negativo y un α-hemolítico de estreptococos. Estos factores disminuyen el riesgo de endometritis y por ende, pueden ser considerados en el futuro para la prevención de la enfermedad.

CAPÍTULO III

PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUB-CLÍNICA POST-PARTO EN TRES HATOS LECHEROS DE PUERTO RICO

INTRODUCCIÓN

La endometritis sub-clínica (**ES**), se define como la inflamación limitada al endometrio del útero presente a partir de los 21 días post- parto (dpp), sin observación de ningún signo clínico (Barlund *et al*., 2008; Dubuc *et al*., 2010). Histológicamente, esta condición se caracteriza por una ruptura de la superficie del epitelio, permitiendo la entrada de células inflamatorias, acumulación de linfocitos y células del plasma en las capas superficiales (Meira *et al*., 2012; LeBlank, 2007). Por no demostrar signos clínicos, la ES es detectada por la presencia y el porcentaje de células polimorfo nucleadas (**PMN**), a través de la citología endometrial (**CE**) (Sheldon *et al*., 2002; Santos *et al*., 2009; Galvao *et al*., 2009; Dubuc *et al*., 2010; Meira *et al*., 2012).

La ES es común en vacas lecheras. En estudios para determinar su frecuencia, Sheldon *et al*. (2009) encontraron que varía entre el 37- 74% y Santos *et al*. (2009) estimaron que es > 50% en todas las vacas a la séptima semana post- parto. Las vacas que han sufrido de esta enfermedad presentan una tasa de concepción subsecuente de aproximadamente 20% menor que vacas sanas (Sheldon *et al*., 2009).

La ES desmejora la eficiencia reproductiva en las vacas lecheras de diversos modos. Se ha asociado con incrementos en el intervalo de parto al primer servicio (Kasimanickam *et al*., 2004; Melcher *et al*., 2014), intervalo parto-concepción e intervalo parto-parto (Plöntzke *et al*., 2010); número de días abiertos (Melcher *et al*., 2014) y número de servicios necesarios por preñez (Kasimanickam *et al*., 2004; Plöntzke *et al*., 2010; Madoz *et al*., 2013). Otras tendencias negativas incluyen una disminución en la tasa de preñez al realizar la inseminación artificial (**IA**) y retraso en el inicio de la actividad ovárica cíclica post-parto, lo que conlleva extensión en la fase lútea (Melcher *et al*., 2014). Estos cambios le causan al ganadero aumento de gastos por concepto de semen para la IA, servicios profesionales y

medicamentos (Schaab *et al*., 2010), también mantenimiento y alimentación de las vacas en periodo de baja productividad (Melcher *et al*., 2014). Por último, hay pérdida a consecuencia del aumento en animales descartados por infecundidad (Melcher *et al*., 2014).

Según Kasimanickam *et al* (2004), la mayoría de las vaquerías presentan una deficiencia en el manejo reproductivo del hato. Una causa contribuyente de esta situación son las infecciones uterinas en las vacas lecheras cuyo efecto negativo queda por cuantificar. Al presente, no se ha estudiado la prevalencia de ES en los hatos lecheros del país. Es importante optimizar la eficiencia reproductiva en los hatos lecheros para así maximizar las ganancias económicas de la operación. A tales efectos, el objetivo de esta investigación es estimar la prevalencia de ES en un muestreo de hatos lecheros de Puerto Rico.

En el presente estudio, se analizará la prevalencia de endometritis sub-clina en tres hatos lecheros de Puerto Rico y se evaluará el efecto de raza, época, número de lactancias y localidad según la técnica de citología endometrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Animales *y Diseño Experimental*

El presente estudio se llevó a cabo en Puerto Rico utilizando 2 épocas del año (caliente vs. fresca). La época caliente fue entre los meses julio a septiembre de 2013 con una temperatura ambiental promedio de 31.8 ºC (http://www.srh.noaa.gov/sju/) y la época fresca cubrió los meses de enero a marzo de 2014 con una temperatura ambiental promedio de 18.1 ºC (http://www.srh.noaa.gov/sju/). Durante la época cálida se muestrearon un total de 55

vacas de las razas: Holstein (n=32), Jersey (n=9), Brown Swiss (n=11) y cruces (n=3). Para la época fresca fue un total de 53 vacas de las razas: Holstein (n=22), Jersey (n=13), Brown Swiss (n=5) y cruces (n=13). Fueron seleccionadas vacas uníparas (n=43) y multíparas (n=64). El estudio se llevó a cabo en los municipios de Lajas, Moca y Camuy, ubicados entre la parte sur-oeste y norte-oeste de Puerto Rico. Las vacas fueron examinadas a los 45±7 dpp utilizando la citología endometrial. A través de los registros del DHI, se excluyeron animales que presentaron distocia, aborto, retención de placenta, descargas uterinas y animales expuestos a tratamientos intrauterinos en o posterior a su último parto.

B. *Colección de Muestras y Determinación de Endometritis Sub-Clínica*

La endometritis sub-clínica fue determinada por citología endometrial descrita previamente por Bacha y Gudeta (2010). Las células del endometrio fueron colectadas por medio del "cytobrush" (**CB**) (Endocervical Brush) (Figura, 1 Panel A), instrumento modificado para el uso en el ganado vacuno. Brevemente, los CB fueron cortados aproximadamente a 2 cm de largo y posteriormente enroscados en la varilla de inseminación (Figura, 1 Panel C). A esta se le colocó el protector plástico (Continental Plastic, Proudly American) (Figura, 1 Panel B) para mantener la varilla estéril una vez fue introducida en la vagina. El instrumento fue introducido hasta pasar la cérvix y se uso el CB dentro del útero. Luego se frotó el CB a la pared uterina y posteriormente el instrumento se retractó dentro de la varilla de inseminar la cual fue removida del útero. Por último, la muestra citológica fue puesta en laminillas y luego los CB entre cada muestra se desecharon. Para minimizar la contaminación de las muestras, la colección de muestras se realizó mediante prácticas asépticas; como lavar la vulva y el área del peritoneo con agua y posteriormente secada con

papel toalla, se utilizó guantes para evitar contaminación de las muestras y la varilla de inseminar fue desinfectada entre cada muestra con alcohol etílico al 70%.

Panel A

Panel B

Panel C

Figura 1: Fotografías del instrumento utilizado en el estudio para realizar la citología endometrial. (A) Cepillo utilizado para colectar las muestras "cytobrush", (B) Protector plástico para la varilla de inseminar, (C) Varilla de inseminar armada con el cepillo y el protector plástico que lo recubre.

C. Citología

El procedimiento de la citología endometrial se llevó a cabo frotando el CB en laminillas y fijando la muestra con un cito fijador (CytoPrep, Fixative, Fisher Scientific Co. Pittsburgh, PA 15106) (Figura, 2 Panel B) que ayuda a reducir la degradación celular. Para el análisis de citología endometrial se utilizó y siguieron las instrucciones del protocolo del "Dip Quick Stain" (kit J0322, Jorgensen Laboratories, Loveland, CO) (Figura, 2 Panel A)

Posteriormente se procedió a examinarla bajo el microscopio a 400X (Figura, 2 Panel C). El porcentaje de células polimorfo nucleares (**PMN**) se determinó por el conteo de entre 80-100 células representativas bajo el foco visual (objetivo 40X) (Figura. 3) Muestras con ≥ 5% de células PMN en los 45±7 dpp, fueron diagnosticadas con endometritis sub-clínica.

Panel A Panel B Panel C

Figura 2: Productos utilizados para la tinción y fijación de las células. (A) Tinte "DipQuick Stain" #1 (Counter Stain) y #2 (Stain Solution), (B) Spray Fijador de células (Fixative), (C) Computador y microscopio utilizado para la observación y conteo de las células polimorfo nucleadas.

Panel A Panel B

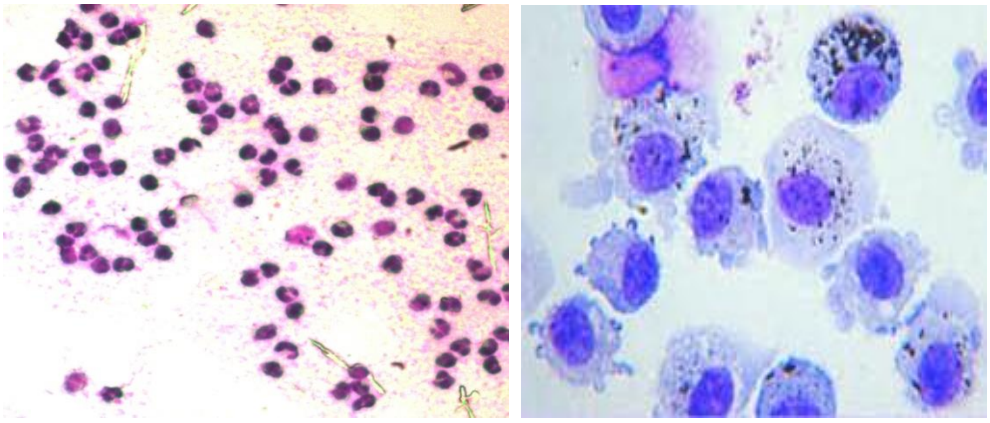


Figura 3: Imágenes observadas bajo microscopio de las diferentes células polimorfo nucleadas. A) Neutrófilos. B) Macrófagos

D. Análisis Estadístico

Para analizar la prevalencia de endometritis sub-clínica se utilizó el PROC GLIMMIX de SAS (SAS software, Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) en una distribución binomial. El modelo fue:

$$E(Y) = \frac{e^{(\beta 0 + \alpha i + \alpha j + \alpha k + \alpha l)}}{1 + e^{(\beta 0 + \alpha i + \alpha j + \alpha k + \alpha l)}}$$

donde;

E (Y)= Valor esperado en la población con endometritis sub-clínica

$\beta 0$ = Endometritis sub- clínica

αi= Razas

αj =Época

αk= Número de lactancias

αl= Localidad

H0= $p \leq 0.05$

Ha= $p \geq 0.05$

RESULTADOS

De las muestras obtenidas de 108 vacas, cuatro fueron excluidos del análisis debido a contaminación ocurrida en el proceso de muestreo y tres adicionales fueron excluidas debido por la pobre visibilidad de células en las laminillas preparadas para la citología endometrial. Entre las muestra de las 101 vacas restantes se encontró prevalencia de ES de 8.9% (Figura 4). La proporción de diagnosis positiva no difirió entre razas (P= 0.73), siendo los respectivos porcentajes para las vacas Holstein, Brown Swiss, Jersey y cruces de 10.4±4.4, 18.7±9.7, 0 y 6.3±6%, respectivamente (Figura 5). El número de lactancias tampoco influenció (P= 0.60) en el desarrollo de ES, al detectar la misma en 7.1±3.4% de las vacas primíparas y 10.2±3.4% de las multíparas (Figura 6). El efecto de época sobre la ES tampoco alcanzó significación (P=0.34) al observar una tasa de 6.1±3.4% en E1 y 11.5±4.4% en E2 (Figura 7). En cuanto a la localidad de la finca, no se observó efecto significativo (P=0.56) sobre la ES, registrándose 5.5±3.8% en Moca, 6.6±6.4% Lajas y 12±4.6% Camuy (Figura 8).

Tabla 1. Distribución de números de vacas diagnosticadas por raza, época, lactancia y localidad con los correspondientes números de resultados positivos para endometritis sub-clínica.

		Holtein		Jersey		Brown Swiss		Cruce		Total de animales	
		N total	**N positivo**	**N total**	**N positivo**	**N total**	**N positivo**	**N total**	**N positivo**	**N total**	**N positivo**
Época 1	**Lajas**	13	1	0	0	0	0	0	0	13	1
	Moca	11	0	1	0	0	0	3	0	15	0
	Camuy	8	2	8	0	11	1	0	0	27	3
	Sub total	32	3	9	0	11	0	3	0	55	4
Época 2	**Lajas**	3	0	0	0	0	0	0	1	3	1
	Moca	10	1	4	0	0	0	11	0	25	1
	Camuy	9	1	9	0	5	2	2	0	25	3
	Sub total	22	2	13	0	5	2	13	1	53	5
	TOTAL	**54**	**5**	**22**	**0**	**16**	**2**	**16**	**1**	**108**	**9**
Número de lactancia											
	Primíparas	18	2	11	0	10	1	3	0	42	3
	Multíparas	30	3	10	0	6	2	13	1	59	6
	TOTAL	**48**	**5**	**21**	**0**	**16**	**3**	**16**	**1**	**101**	**9**

Tabla 2. Resumen de resultados de otras investigaciones publicadas sobre la tasa de frecuencia de endometritis sub-clínica durante el post-parto en bovinos de razas lecheras y de carne.

Localidad	**Método utilizado**	**Umbral de conteo de células PMN**	**Días post-parto**	**Raza**	**Número de Hatos**	**Número de vacas totales**	**Número de vacas positivas**	**% de vacas positivas a ES**	**Referencia**
New York	Lavado uterino	≥4%	49dpp	Holstein	5	406	271	38.2%	(1)
Western Collage of Veterinary Medicine	Vaginoscopía, cytobrush, lavado uterino	>8%	28-41dpp	Holstein	8	221	189	11.1%	(2)
New York	Lavado uterino	>5%	40-60dpp	Holstein	5	141	23,26,35, 38,19	74, 54, 49, 50, 37	(3)
Ontario, Canadá	Cytobrush	>10%	V2: 34-47dpp	Holstein	2	228	89	41.1%	(4)
Etiopía	Lavado uterino	≥5%	28dpp 56dpp	Zebu x Friesian	1	59	28 18	47.5% 30.5%	(5)
Argentina	Cytobruch	≥5%	18-38dpp	Holstein	3	194	74/194	38%	(6)
Universidad de Alberta	Cytobruch	>8%	28-41dpp	Holstein	1	39	19	49%	(7)

Tabla 3. Prevalencia (media ± error estándar) de endometritis sub-clínica en vacas lecheras lactantes por raza.

Raza	Media	Error Estándar	Pr > F
BS	0.1875	0.09758	0.73
Hol	0.1042	0.04409	
J	0.9635	0.000150	
Cruce	0.0101	0.06052	

Tabla 4. Prevalencia (media ± error estándar) de endometritis sub-clínica en vacas lecheras lactantes por número de lactancia.

Lactancias	Media	Error Estándar	Pr > F
Primíparas	0.07143	0.03974	0.60
Multíparas	0.1017	0.03935	

Tabla 5. Prevalencia (media ± error estándar) de endometritis sub-clínica en vacas lecheras lactantes por época.

Época	Media	Error Estándar	Pr > F
Calor	0.06122	0.03425	0.34
Fresca	0.1154	0.04430	

Tabla 6. Prevalencia (media ± error estándar) de endometritis sub-clínica en vacas lecheras lactantes por localidad

Localidad	Media	Error Estándar	Pr > F
Moca	0.0002	0.03818	0.56
Lajas	0.06667	0.06441	
Camuy	0.1200	0.04596	

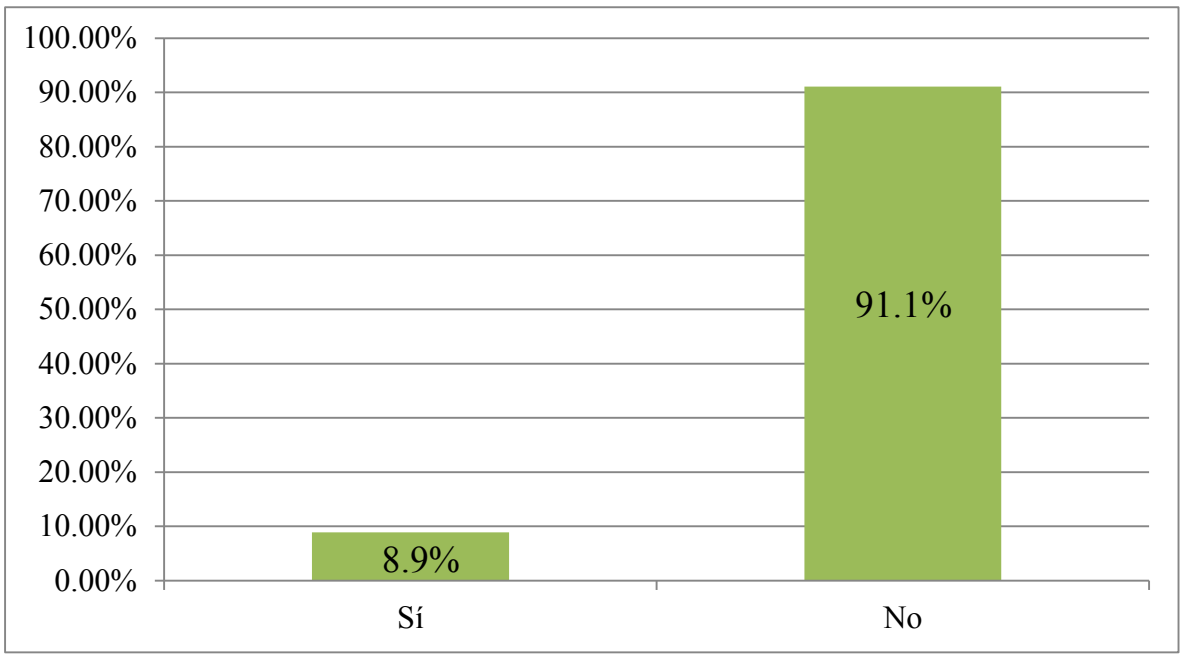
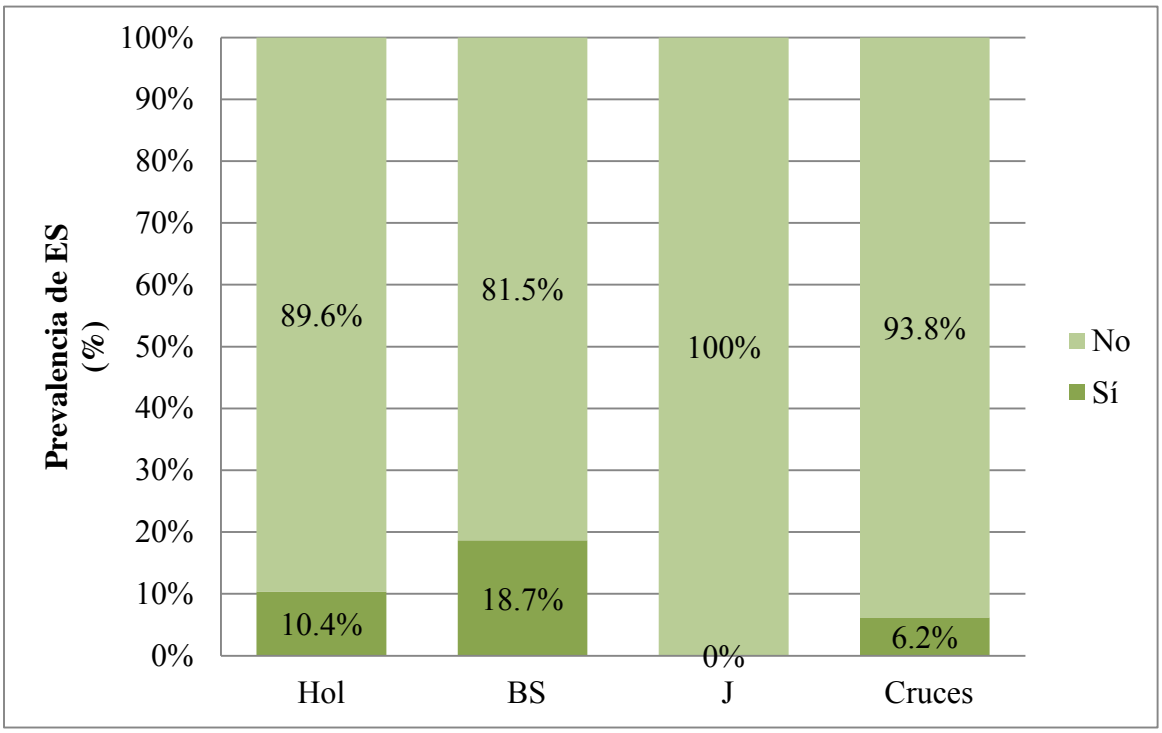


Figura 4. Porcentaje de vacas con endometritis sub-clínica

Figura 5: Porcentaje de vacas que presentan endometritis sub-clínica por raza. (p= 0.73)



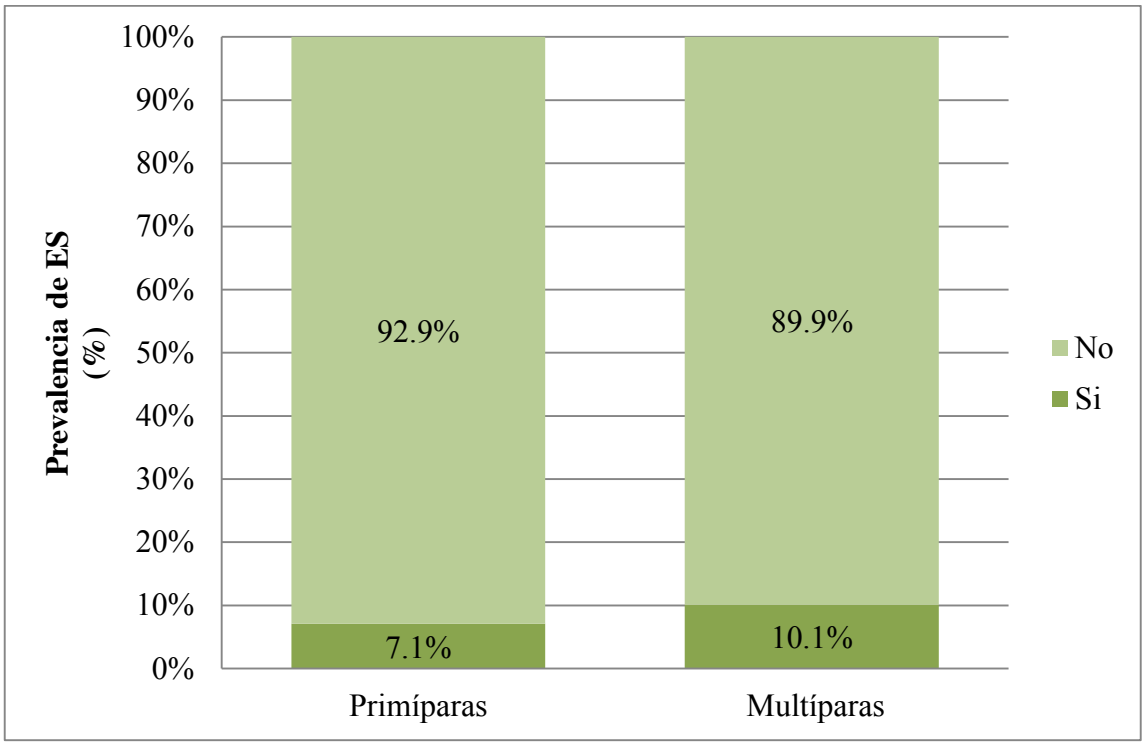


Figura 6: Porcentaje de vacas que presentan endometritis sub-clínica por lactancia.(p= 0.60)

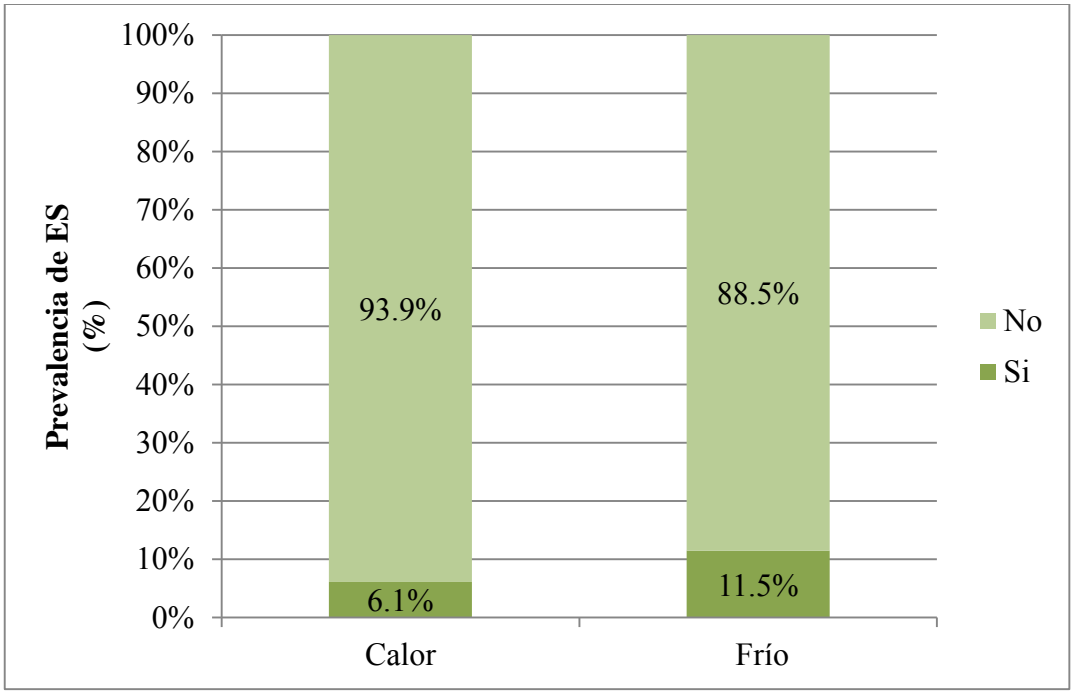


Figura 7: Porcentaje de vacas que presentan endometritis sub-clínica por época. (p= 0.34)

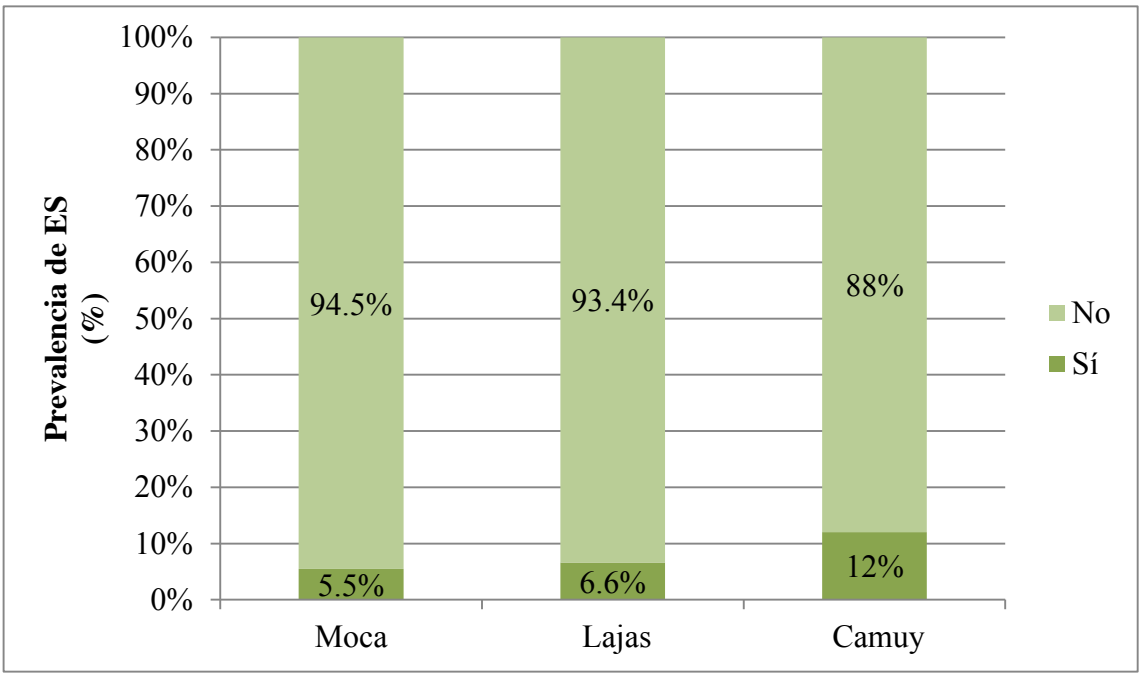


Figura 8: Porcentaje de vacas que presentan endometritis sub-clínica por localidad.(p=0.56)

DISCUSIÓN

En el tiempo post-parto el ambiente uterino en vacas lecheras se encuentra susceptible a la entrada de patógenos y por consiguiente infecciones uterinas. Por tal razón, las células polimorfo nucleares (PMN) son la primera línea de defensa al ocurrir una infección a nivel del útero (Hammon *et al*., 2006). En su estudio Hammon *et al* (2006) indica que la función de las células PMN en vacas lecheras comienza a declinar entre las 3-5 semanas antes del parto. Una vez la vaca pare, ésta se vuelve susceptible a adquirir patógenos en el periodo post-parto, por consiguiente, para detectar ES en vacas, el conteo de células PMN en la citología uterina es una herramienta importante en la evaluación de la inflamación del endometrio en hembras (Cocchia *et al*., 2012).

En el presente estudio se analizó la prevalencia de endometritis sub-clínica en hatos lecheros de Puerto Rico. Hasta donde conocemos, esta es la primera investigación que se realiza en Puerto Rico sobre este tema. El tiempo de examinación para este estudio fue de 45±7 dpp. Se utilizó un umbral de ≥5% en el conteo de neutrófilos para la identificación de

ES. En otras investigaciones, Galvao *et al*. (2009) uso un umbral de ≥4% para el 49 dpp como indicativo de ES. Por otro lado, Barlund *et al*. (2008) utilizó un umbral de >8% entre los 28-41 dpp y Gilbert *et al*. (2005) utilizó un umbral de >5% de neutrófilos para los 40-60 dpp indicativo de ES. Utilizando esta última definición de ES, el presente estudio encontró una prevalencia en ES de 8.9% (9/101). El estudio de Gilbert *et al*. (2005a) reportó que para el segundo muestreo en la semana 8 post-parto, ocurre una disminución de la inflamación uterina. Muchos estudios sobre vacas lecheras (Holstein) como los de Gilbert *et al*. (2005) y Kasimanickam *et al*. (2004, 2005) y en ganado de carne (Angus) como el de Santos *et al*. (2009) mostraron que la prevalencia de ES disminuye a medida que aumentan los días post-parto. En comparación con el presente estudio, investigaciones previas de Kasimanickam *et al*. (2004) encontró un 41.1% de prevalencia de ES en los 34-47dpp en ganado Holstein, mientras que el estudio de Gilbert *et al*. (2005) reportó la prevalencia de ES en un 53% en vacas Holstein examinadas en los 40-60 dpp. Los resultados de ambas investigaciones previas muestran una reducción en la inflamación al aumentar los días post-parto en la vaca.

En el presente estudio, se utilizaron las razas Holstein, Brown Swiss, Jersey y cruces. En estudios previos variaba la raza utilizada; por ejemplo, la raza Holstein fue estudiada en la investigación de Gilbert *et al*. (2005), Plontzke *et al*. (2010), Galvao *et al*. (2009, 2010); la raza Angus por Santos *et al*. (2009) y el cruce de Zebu x Friesian estudiada por Bacha y Regassa (2010). En el presente estudio no se encontró diferencia entre razas para la prevalencia de ES, lo que concuerda con investigaciones previas donde no se encontró diferencias entre razas para esta variable.

Además, el tamaño de las instalaciones podría afectar la prevalencia de ES en relación al manejo y control de la vaca lechera. En esta investigación el número de animales en ordeño por finca utilizado para el análisis de la prevalencia de ES entre razas era más pequeño en

comparación con fincas comerciales del extranjero. El números de animales en ordeño del presente estudio era de alrededor de 90 a 260 vacas por finca, en comparación con estudios de Galvao *et al*. (2009), Dubuc *et al*. (2010), Couto *et al*. (2013) o Kasimanickam *et al*. (2006), que comprendían entre 275 a 1,044 vacas por instalación comercial. Por consiguiente, al manejar instalaciones relativamente pequeñas en comparación con vaquerías comerciales del extranjero, podría facilitar el manejo y control de los animales evitando así el contagio de infecciones uterinas por falta de hábitos de limpieza en las instalaciones.

Otros estudios indican la temporada en la cual se tomaron las muestras (LeBlanc *et al*., 2002; Dubuc *et al*., 2010), pero no analizaron el efecto de época en relación a la prevalencia de ES. Por el contrario, la presente investigación sí analizó el efecto de la época pero no se encontró diferencias entre ellas respecto a la prevalencia de ES.

En estudios previos de Dourey *et al*. (2011), Bacha y Regassa. (2010) y Galvao *et al*. (2010), se encontraron resultados variados en la prevalencia de ES para el efecto del número de lactancias (primíparas versus multíparas). Dourey *et al*. (2011) encontró que vacas primíparas poseían mayor conteo de células PMN que contribuían al aumento en intervalo de ovulación versus vacas multíparas. Bacha y Regassa (2010) encontrarón que la prevalencia de ES en vacas primíparas y multíparas no fue diferente para la cuarta semana en estudio (56.2% vs 44.2%, respectivamente P= 0.49) versus la octava semana post-parto (50.0% vs 25.6%, respectivamente P=0.08). Por último, el estudio de Galvao *et al*. (2010) reportó una prevalencia de ES mayor en vacas multíparas versus vacas primíparas de un 36% vs 19% (P= 0.09), respectivamente. En contraste al presente estudio, no se encontró diferencias en la prevalencia de ES entre vacas primíparas y multíparas.

Por último, se midió la prevalencia de ES en las 3 localidades analizadas en Puerto Rico. En contrastes con la investigación de Plontzke *et al*. (2010) con 3 granjas comerciales en Buenos Aires, Argentina, este estudio no analizó la prevalencia de ES por localidad versus el estudio de Gilbert *el at*. (2005). En este último, el número total de animales provenía de 5 localidades comerciales (A, B, C, D y E) en Nueva York y se determinó la prevalencia individual de las localidades; 74, 56, 49, 49 y 37%, respectivamente. En el presente estudio, no se encontró diferencia (P>0.56) en la prevalencia de ES por localidad. La vaquería de Moca, Lajas y Camuy, reflejaron una prevalencia de 5.5, 6.6 y 12.0%, respectivamente. En comparación con estudios de otros países, los resultados de esta investigación demuestran una baja prevalencia de endometritis sub-clínica.

Los resultados en el estudio de Bacha y Regassa (2010) mostraron que la endometritis sub-clínica en vacas Zebu x Friesian (n=59) prevalecía al utilizar la técnica de lavado uterino en vacas lecheras clínicamente sanas durante el periodo post-parto en un 47.5 y 30.5% para la semana cuarta y octava, respectivamente. Esta fue comparable a la notificada por Gilbert *et al*. (2005) en su estudio con vacas Holstein (n= 141) utilizando la técnica de lavado uterino, donde la prevalencia general de ES de los cinco hatos lecheros fue de 53%. En contraste, Kasimanicham *et al*. (2004) utilizaron el método de "cytobrush" en lugar de lavado uterino en vacas Holstein Friesian de dos hatos lecheros (n=228), he informó prevalencia ligeramente inferior en los resultados de prevalencia ES en un 51% y 41% para la visita 1 y vistita 2, respectivamente.

La variación en los resultados observados en el presente estudio se puede deber, además, a los días post-parto utilizados. En la investigación de Meira *et al*. (2012) éstos analizarón las muestras en un intervalo entre los 21-47 dpp, utilizando un umbral de ≥18%

para el intervalo de 21-33 dpp y luego, utilizarón un umbral de ≥10% para el intervalo de 34-47 dpp. En su estudio, encontrarón prevalencia de ES en los resultados obtenidos. Otro ejemplo es el estudio de Dourey *et al*. (2011) donde se analizaron las muestras en el día 25 post-parto, con un umbral de ≥8% en el cual se encontró prevalencia de ES. En contraste con el presente estudio donde la prevalencia general de ES (n=101) fue 8.9%, en los días 45±7 post-parto (≥5%), Bacha y Regassa (2010) encontraron una prevalencia de 30.5% en la octava semana post-parto utilizando un umbral de ≥5%. El estudio de Gilbert *et al*. (2005) indica también una alta prevalencia de ES, 53% en los días 40-60 post-parto. Estas investigaciones tuvieron resultados variados en comparación al presente estudio, donde no se encontró prevalencia de ES.

En condiciones normales, se asume que a medida que van aumentando los días post-parto en el animal, disminuye sustancialmente la inflamación del endometrio junto con el conteo de células PMN. Esto se debe a la estabilización y limpieza de la región uterina del animal reflejando así una involución normal (Baranski *et al*., 2012), llevando a cabo la recuperación del endometrio durante el periodo post-parto. A diferencia de vacas que padecen de ES, este proceso ocurre de manera anormal, provocando un retraso en la estabilización del útero y de la involución uterina.

En nuestro estudio, la endometritis sub-clínica no tuvo una prevalencia significativa, por ende, no se encontró un impacto negativo en el manejo reproductivo en los hatos lecheros analizados en Puerto Rico. Contrario a lo que se esperaba, Puerto Rico al ser un país tropical la endometritis sub-clínica encontrada en las 3 localidades de esta investigación fue baja. Observaciones hechas a través del estudio indican que, cada localidad tomaba las medidas necesarias en el manejo del hato lechero de acuerdo a los protocolos de rutina empleadas por los respectivos encargados o veterinarios del lugar. Un factor importante en la reducción de

ES es el mantenimiento óptimo en la higiene durante el periodo peri parturiente y el post-parto, así como, la identificación temprana de animales enfermos. Estos esfuerzos por mantener un buen control en la identificación de los individuos predispuestos, ayudan al beneficio económico de la empresa lechera en Puerto Rico.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

En nuestro estudio, la endometritis sub-clínica no tuvo una prevalencia significativa, por ende, no se encontró un impacto negativo en el manejo reproductivo en los hatos lecheros analizados en Puerto Rico. Según Kasimanickam *et al*., (2004), la mayoría de las vaquerías presentan una deficiencia en el manejo reproductivo del animal, lo que afectaría la eficiencia de producción. Contrario a lo que se esperaba, Puerto Rico al ser un país tropical la endometritis sub-clínica encontrada en las 3 localidades de esta investigación fue baja. Por consiguiente, se puede pensar que las tres vaquerías analizadas llevaban un manejo y control de los animales adecuados para evitar enfermedades uterinas post-parto. Algunas de las prácticas que se realizan en las vaquerías examinadas que ayudan en la reducción de enfermedades uterinas son: buen cuidado de vacas próximas a parir, instalaciones aptas para el parto, buena higiene, manejo y trato adecuada a las vacas, visita del veterinario constante y la utilización de tratamientos preventivos para diferentes enfermedades. Estas buenas prácticas del ganadero hacia sus animales beneficien la salud del hato lechero.

Por otro lado, las infecciones uterinas son una de las múltiples causas de deficiencia reproductiva, por lo que se recomienda evaluar en futuras investigaciones causas adicionales tales como: detección de celo, el programa de sincronización de celo, alimentación,

inseminación artificial o manejo del semen, entre otras. La baja prevalencia de endometritis sub-clínica en las tres localidades analizadas indica que existe un mantenimiento en los hábitos de limpieza y un buen manejo en los procedimientos del parto y post-parto. Estos esfuerzos por mantener un buen control en la identificación de los individuos predispuestos, ayudan al beneficio económico del agricultor.

Esta investigación utilizó la técnica de la citología endometrial para la detección de endometritis sub-clínica, por lo tanto, seria efectico y conveniente realizar un análisis económico sobre el costo que conllevaría la utilización y enseñanza de esta técnica a los ganaderos. Esto ayudaría a la temprana identificación de la enfermedad y sería de utilizad para los ganaderos a tratar estos animales con anterioridad, reduciendo así el número de días abierto. Lo anterior a su vez, tendría implicaciones económicas más para los ganaderos.

CAPÍTULO V

REFERENCIAS

Bacha, B y Regassa, F. G. (2010). *Subclinical endometritis in Zebu x Friesian crossbred dairy cows: its risk factors, association with subclinical mastitis and effect on reproductive performance*. Trop Anim Health Prod 42:397–403. doi 10.1007

Barański,W. Podhalicz-Dzięgielewska, M. Zduńczyk, S. Janowski, T. (2012).*The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds*. Theriogenology, Volume 78, P: 1939-1947

Barlund, C.S., Carruthers, T.D., Waldner, C.L., Palmer, C.W., (2008). *A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle*. Theriogenology 69, 714-723

Cocchia, N, Paciello, O. Auletta, L. Uccello, V. Silvestrod, L. Mallardo, K. Paraggio, G. Pasolini, M.P. (2012). *Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares*. Theriogenology 77 (2012) 89–98

Dascanio, J., B. Ley, W. y Bowen, J. M. (1997). *How to Perform and Interpret Uterine Cytology*. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. Vol. 43

Dominguez, G., Magnasco, M., Magnasco, R., Hernandez, J., Risco, C., de la Sota, R. (2006). *Effect of clinical endometritis on reproductive performance in Holstein cows in Argentina*. Theriogenology 66, 679-680

Dourey, A., Colazo, M.G.,Barajas, P. B.,Ambrose, D. J. (2011). *Relationships between endometrial cytology and interval to first ovulation, and pregnancy in postpartum dairy cows in a single herd*. Veterinary Science 91 (2011) 149- 153.

Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J. (2010). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. J. Dairy Sci. 93:5225–5233 doi: 10.3168/jds.2010-3428

Foldi, J., Kulcs´ar, M., Pecsi, A., Huyghe, B., da Sa, C., Lohuis, J.A.C.M., Cox, P., y Huszenicza, Gy. (2006). *Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle*. Animal Reproduction Science 96 (2006) 265–281

Galvão, K.N, Flaminio, M.J.B.F, Brittin, S.B, Sper, R, Fraga, M., Caixeta, L., Ricci, A., Guard, C. L., Butler, W. R., y Gilbert, R. O. (2010). *Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows*. J. Dairy Sci. 93:2926–2937. doi: 10.3168/jds.2009-2551

Galvão, K. N., Frajblat, M., Brittin, S. B., Butler, W. R., Guard, C. L., y Gilbert, R. O. (2009a). *Effect of prostaglandin F2α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows*. J. Dairy Sci. 92:4906–4913. doi: 10.3168/jds.2008-1984

Galvão, K. N., Greco, L. F., Vilela, J. M., Sá Filho, M. F. y Santos, J. E. P. (2009b). *Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows*. J. Dairy Sci. 92:1532–1542. doi: 10.3168

Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H. (1998). *Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows*. Theriogenology 49.1.

Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H.N., Frajblat, M. (2005). *Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows*. Theriogenology 64, 1879-1888

Hammon, D. S., Evjen, I. M., Dhiman, T. R., Goff, J. P. y Walters, J. L. (2006). *Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders*. Veterinary Immunology and Immunopathology 113: 21–29

Kasimanickam, R., Cornwell, J. M. y Nebel, R. L. (2006). *Effect of presence of clinical and subclinical endometritis at the initiation of Presynch–Ovsynch program on the first service pregnancy in dairy cows*. Animal Reproduction Science 95: 214–223

Kasimanickam, R., Duffielda, T. F. Foster, R. A., Gartleya, C.J., Lesliea, K.E., Walton, J.S. y Johnsona, W.H. (2004). *Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows*. Theriogenology 62: 9–23

Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., Johnson, W. H., (2005). *The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with sublinical endometritis*. Theriogenology 63: 818–830

Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S., Johnson, W.H. (2005). *A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows*. Can Vet J 46: 255-259

LeBlanc, S. J. (2007). *Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review*. The Veterinary Journal 176: 102–114

LeBlanc, S.J., Duffield, T.F., Leslie, K.E., Bateman, K.G., Keefe, G.P., Walton, J.S., Johnson, W.H., (2002). *Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows*. J Dairy Sci 85: 2223- 2236.

Madoz, L.V. Giuliodori, M.J. Jaureguiberry, M. Plöntzke, J. Drillich, M. De la Sota. R. L. (2013). *The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows*. Journal of Dairy Science, 96: 4333-4339

Meira Jr. E. B. S. Henriques, L. C. S. Sá, L. R. M. Gregory, L. (2012). *Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows*. J. Dairy Sci. 95: 6969–6973

Melcher, Y. Prunner, I. Drillich, M. (2014). *Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis*. Theriogenology 1–7

Plöntzke, L.V. Madoz, R.L. De la Sota, M. Drillich, W. Heuwieser. (2010). *Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina*. Animal Reproduction Science, 122: Issues 1–2, P. 52-57

Salasel, B., Mokhtari, A. y Taktaz, T. (2010). *Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows*. Theriogenology 74: 1271–1278

Santos, N. R., Lamb, G. C., Brown, D. R. y Gilbert, R. O. (2009). *Postpartum endometrial cytology in beef cows*. Theriogenology 71: 739–745

Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G. y Schuberth, H. J. (2009a). *Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle*. Biology of reproduction. 81, 1025–1032. DOI 10.1095

Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S. y Gilbert, R. O. (2006). *Defining postpartum uterine disease in cattle***.** Theriogenology 65: 1516–1530. doi:10.1016

Sheldon, I.M., Noakes, D.E., Rycroft, A.N., Dobson, H. (2002). *Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows*. Vet Rec 151: 531-534.

Sheldon, I. M., Price, S. B., Cronin, J., Gilbert, R. O. y Gadsby, J. E. (2009b). *Mechanisms of Infertility Associated with Clinical and Subclinical Endometritis in High Producing Dairy Cattle*. Reprod Dom Anim 44 (Suppl. 3), 1–9. doi: 10.1111

Westermann, S. Drillich, T.B. Kaufmann, L.V. Madoz, W. Heuwieser. (2010). *Aclinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows*. Theriogenology 74: 1248- 1255

http://www.srh.noaa.gov/sju/

http://www.thecattlesite.com