



IRAC

INSTITUTO DE REPRODUCCION ANIMAL CORDOBA



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC)
Escuela para Graduados

**ASOCIACIÓN ENTRE LA MASTITIS
SUBCLÍNICA CON LA PÉRDIDA TEMPRANA DE
GESTACIÓN EN UN HATO DE VACAS
LECHERAS**

Santiago Xavier Miranda Bohórquez

Tesis
Para Obtener el Grado Académico de
Magíster en Reproducción Bovina

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados
Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC)

Córdoba, 2018

**ASOCIACIÓN ENTRE LA MASTITIS SUBCLÍNICA CON LA PÉRDIDA
TEMPRANA DE GESTACIÓN EN UN HATO DE VACAS LECHERAS**

Santiago Xavier Miranda Bohórquez

Comisión Asesora de Tesis

Director: DMTV (M.Sc.) Christian Albuja _____

Asesores:

DMTV (Ph.D.)Huberto Tríbulo (Co-director) _____

Tribunal Examinador de Tesis

Dra. Sc. Blgs. Mariana Caccia _____

Med. Vet. Dr. Pablo Roberto Marini _____

M.V.M.Sc. Jorge Carcedo _____

Presentación formal académica

20 de Marzo de 2018

Instituto de Reproducción Animal Córdoba

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela para Graduados

Universidad Nacional de Córdoba

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de tesis se realizó en la hacienda Sausalito S.C.C de propiedad de la familia Montúfar, a Sebastián Montúfar por la amistad, apoyo incondicional, por la apertura y brindar todas las facilidades para desarrollar la tesis. A Benjamín Alvear administrador de la hacienda por brindarme su amistad y apoyo.

A mi director de tesis Christian Albuja, por su colaboración y constante apoyo tanto en la realización de la tesis como en mi formación profesional.

A mi codirector de tesis Dr Humberto Tríbulo y profesores del IRAC por brindarme todos sus conocimientos teóricos y prácticos.

Al Dr. Gabriel Bó por su colaboración en mi tesis. Persona a quien admiro por ser uno de los máximos exponentes en reproducción bovina a nivel mundial y tener la amabilidad y humildad de compartir sus conocimientos.

A mi esposa Joha por el apoyo incondicional durante mi formación académica.

A mis padres, Marcelo y Marce por darme todo su cariño y amor, en especial a mi Madre y a mi Abuelo Rogelio por enseñarme a amar la ganadería y a la tierra.

A mis hermanos Fer y Gaby por apoyarme en todos mis emprendimientos personales.

A mis compañeros, en especial a Dr. Juan Carlos López por colaborar en la revisión de mi tesis y por brindarme su amistad.

A mi tribunal examinador Mariana, Pablo y Jorge por realizar las respectivas observaciones y recomendaciones para mejorar el documento.

A los directivos de Nestlé Ecuador por permitirme cursar esta Maestría y apoyarme para crecer profesionalmente.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres, Marcelo y Marce por ser mi ejemplo de superación, trabajo, humildad y constancia. A mis hermanos Fer y Gaby por el apoyo incondicional.

Esta tesis dedico con mucho cariño y amor a mi esposa, Joha Mier, por ser mi amiga, compañera que me brindó su apoyo moral incansable para cursar esta Maestría y por ser la motivación principal para alcanzar un sueño que Dios mediante se hace realidad.

A nuestro hijo Leonardo Gabriel que desde el momento de su concepción le amamos con todo nuestro corazón.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la asociación entre los diferentes grados de mastitis subclínica con la pérdida temprana de gestación durante los primeros 90 días post inseminación en vacas lecheras Holstein. Los experimentos se realizaron en las instalaciones de la hacienda Sausalito S.C.C. ubicada en Ecuador, en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Tambillo. Para el estudio se analizaron los datos de 619 vacas, el periodo de estudio se extendió desde octubre de 2015 hasta diciembre de 2016. Se consideró dentro del grupo control vacas diagnosticadas como preñadas a los 30 días postinseminación y que no hubieren presentado mastitis diagnosticada mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT: 0) hasta los 90 días postinseminación. Experimento 1, vacas diagnosticadas como preñadas a los 30 días postinseminación y que presentaron mastitis subclínica grado trazas y mastitis subclínica grado 1 mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT: T y 1) hasta los 90 días postinseminación. Experimento 2, vacas diagnosticadas como preñadas a los 30 días postinseminación y que presentaron mastitis subclínica grado 2 y mastitis subclínica grado 3 mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT: 2 y 3) hasta los 90 días postinseminación. El diagnóstico de gestación fue realizado por ultrasonografía entre los 28 y 35 días post inseminación. El seguimiento de la preñez se realizó en dos ocasiones alrededor de los 60 y 90 días utilizando ultrasonografía. Se determinó que existe asociación entre mastitis subclínica grado 2 y 3 con la pérdida temprana de gestación (OR 2,6) ($P < 0,01$). Se especula que un proceso infeccioso en la ubre posterior a la inseminación provocaría liberación de mediadores de la inflamación como la prostaglandina $F2\alpha$ que ocasionaría lisis del cuerpo lúteo y pérdida de la gestación. La pérdida de gestación entre los 30 a 60 días fue del 12 % y entre los 60 a 90 días fue del 5%. En conclusión, vacas que tienen mastitis subclínica de grado 2 y 3 tienen 2,6 veces más chances de tener pérdida de gestación durante los primeros 90 días postinseminación.

Palabras claves: Mastitis, CMT, gestación temprana, cuerpo lúteo, subclínica.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the relationship between the different levels of subclinical mastitis and the early gestation loss during the first 90 post-insemination days in Holstein dairy cattle. The experiments took place at Sausalito S.C.C Farm installations, located in Tambillo, Canton of Mejía, Pichincha Province in Ecuador. For this research were analyzed the data of 619 dairy cattle from October 2015 until december 2016. The tested group had dairy cattle diagnosed as pregnant during the 30 post-insemination days and without mastitis tested by California Mastitis Test (CMT: 0) up to the 90 post-insemination days. Group 1, dairy cattle diagnosed as pregnant during the 30 post-insemination days and presenting subclinical mastitis with traces grade and also subclinical mastitis grade 1 tested by California Mastitis Test (CMT: T y 1) up to the 90 post-insemination days. Group 2, dairy cattle diagnosed as pregnant during the 30 post-insemination days and presenting subclinical mastitis grade 2 and 3 tested by California Mastitis Test (CMT: 2 y 3) up to 90 post-insemination days. The gestation diagnosis was made by ultrasonography between 28 and 35 post insemination days. The monitoring of pregnancy had place twice during the 60 and 90 days using ultrasonography. It concluded the existence of a relationship between the subclinical mastitis grade 2 and 3 with the early gestation loss (OR 2,6) (P <0,01). Its speculates an infective process in the udder after the insemination can induce liberation of inflammation mediators such as F2 α prostaglandin, which induces lysis of the corpus luteum and gestation loss. The gestation loss during the 30 and 60 days was 12% and between 60 and 90 days was 5%. In conclusion dairy cattle presenting subclinical mastitis grade 2 and 3 have 2,6 times more chance to present gestation loss during the first 90 post-insemination days.

Key words: Mastitis, CMT, early gestation, corpus luteum, subclinical.

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN	1
Clasificación de la mastitis de acuerdo al tipo de infección:.....	6
Clasificación de mastitis de acuerdo a su nivel de gravedad.....	6
Pruebas para la detección de mastitis:	7
Reconocimiento materno de la gestación	11
Pérdidas de preñez en bovinos	13
Prevalencia de pérdidas de preñez.....	14
Pérdida de preñez temprana.....	15
Factores de riesgo	15
Calidad del oocito.....	15
Folículo persistente.....	16
Desbalances endocrinos.....	16
Estrés Calórico.....	17
Estado de ciclicidad	18
Condición corporal	19
Programas de sincronización	19
Enfermedades	20
Mastitis	22
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
CAPÍTULO 2.....	29
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Ubicación Geográfica.....	29
Descripción de la Hacienda	29
Unidades de Muestreo	30
Criterios de inclusión.....	30
Criterios de exclusión	30

Tipo de muestreo	30
Factores de estudio	30
Prueba de CMT.....	30
DIAGNÓSTICO DE PÉRDIDAS DE GESTACIÓN	32
Ultrasonografía	32
GRUPO CONTROL.....	33
GRUPO 1.....	33
GRUPO 2.....	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
CAPÍTULO 3.....	34
RESULTADOS	34
Grupo 1	34
GRUPO 2.....	35
TASA DE PÉRDIDA DE GESTACIÓN	36
CAPÍTULO 4.....	40
DISCUSIÓN	40
CAPÍTULO 5.....	45
CONCLUSIONES	45
CAPITULO 6.....	46
BIBLIOGRAFÍA.....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 Relación entre grado de CMT y Rango de Células somáticas.....	10
Tabla 2.1 Interpretación del grado de CMT.	31
Tabla 3.1 Resultados de Odds Ratio (OR) y pvalor del grupo 1 (vacas con mastitis subclínica grado T y 1).....	34
Tabla 3.2 Resultados de Odds Ratio (OR) y pvalor del grupo 2 (vacas con mastitis subclínica grado 2 y 3).	35
Tabla 3.3 Tabla 3.3. Resultados de Odds Ratio (OR) y pvalor de los distintos grados de mastitis subclínica.....	36
Tabla 3.4. Porcentaje de vacas con pérdida de gestación según los grados de mastitis en vacas lecheras Holstein durante los primeros 90 días post inseminación.....	36
Tabla 3.5 Número de vacas que pierden la gestación entre los días 30-60 y 61-90 postinseminación con distintos grados de mastitis subclínica (trazas, grado1, grado 2, grado 3), y ausencia de mastitis en vacas lecheras Holstein.....	37
Tabla 3.6 Número de vacas que pierden la gestación entre los días 30-60 y 61-90 días con la presencia mastitis subclínica (trazas, grado 1, grado 2, grado 3), en vacas lecheras Holstein.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Grados de mastitis subclínica y mastitis clínica.....	32
Figura 2.2 Ecógrafo Mindray DP -10 VET.	32
Figura 3.1 Porcentaje de pérdidas embrionarias y fetales entre los días 30-60 y 61-90 postinseminación en vacas lecheras Holstein.	37
Figura 3.2 Número de pérdidas embrionarias y fetales entre los días 30-60 y 61-90 postinseminación de vacas que presentaron mastitis subclínica (trazas, grado1, grado2, grado3) y ausencia de mastitis en la prueba en leche de CMT.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
ARN.....	Ácido ribonucleico
C.....	Clínica
CCS.....	Contaje de Células Somáticas
CMT.....	California Mastitis Test
CL.....	Cuerpo lúteo
DVB.....	Diarrea Viral Bovina
GnRH.....	Hormona liberadora de gonadotropinas
IBR.....	Rinotraqueitis bovina
IFN-t.....	Interferón tau
LH.....	Hormona luteinizante
LPS	Lipopolisacáridos
mHZ.....	Megahercio
mL.....	Mililitro
mm.....	Milímetros
MS.....	Materia Seca
OR.....	Odds Ratio
P.....	Valor P, valor estadístico calculado
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PI.....	Persistentemente infectados
PSPB.....	Proteína específica de la preñez
S.....	Subclínica
T.....	Trazas

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es la enfermedad infecto contagiosa de la glándula mamaria, en la cual la inflamación se produce como respuesta a la invasión, a través del canal del pezón, de diferentes tipos de bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y hasta algunos virus. Sin embargo, las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y algunos gérmenes Gram -, son responsables de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos. La mastitis es la enfermedad más común y costosa que padece el ganado lechero; son numerosos los estudios que indican la importancia de la enfermedad, principalmente por las pérdidas económicas y los riesgos en la salud pública (Philpot y Nikerson, 2002). Es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas endémicas que afecta a las vacas y otras especies lecheras. DeGraves y Fetrow (1993) estimaron que los gastos asociados con la mastitis para la industria láctea de los EE. UU son más de dos millones de dólares al año.

El impacto negativo de la mastitis recae en la producción, bienestar animal y la calidad de la leche producida (Hillerton y Berry, 2005). La rentabilidad en la industria lechera depende directamente de la eficiencia reproductiva. La tasa de concepción, la tasa de detección de celo y la pérdida de preñez son factores que determinan la eficiencia reproductiva en rodeos lecheros. Sin embargo, la pérdida de preñez por si sola puede tener efectos devastadores en el éxito económico de los rodeos lecheros. Se ha calculado que por cada pérdida de preñez, hay una merma promedio de US \$ 640,00 (Thurmond *et al.*, 1990).

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria, generalmente de origen infeccioso con muchos factores predisponentes, siendo el más importante la falta de higiene en el ordeño. Hay que tomar en cuenta que la mastitis no se puede erradicar y está presente, en mayor o menor grado, en todos los rebaños lecheros del mundo. Según Philpot y Nickerson (2002) la mastitis es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que deriva de las palabras griegas mastos que significa “pechos” e itis que quiere decir “inflamación de”. Constituyendo esta enfermedad una respuesta de los tejidos productores de la leche ante una lesión traumática o la presencia de microorganismos infecciosos que han ingresado a la

ubre. La mastitis es el resultado de la interacción de varios factores: el hombre, la vaca, el medio ambiente, los microorganismos y el manejo. La enfermedad puede cursar como subclínica (la de mayor prevalencia en un rodeo) o como clínica, con alteraciones macroscópicas de la leche y síntomas palpables de la ubre y, a veces, de tipo sistémico en todo el animal. Clásicamente se la ha definido como una “enfermedad multifactorial” porque el riesgo de infección depende de la habilidad de la vaca para rechazarla, del tipo, número y de la patogenicidad de las bacterias presentes en un rodeo y, fundamentalmente, de las condiciones del ambiente, del manejo en general y del manejo del ordeño en particular que se estén desarrollando en un establecimiento.

El costo de la mastitis va más allá de la asociada a la pérdida de leche, aumento de las tasas de descarte y costos de tratamientos ya que afecta indirectamente el desempeño reproductivo en vacas lecheras mediante la alteración de los intervalos interestros, acortamiento de la fase lútea (luteólisis prematura) y pérdidas de gestación (Moore *et al.*, 1991).

La infección de la glándula mamaria ocurre en tres etapas: invasión, infección e inflamación (Radostits, 1992). En la invasión los microorganismos pasan del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el conducto glandular. Durante la infección los gérmenes se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario, estableciéndose una población bacteriana en el canal del pezón o conducto glandular para diseminarse en el tejido mamario por último en la inflamación aumenta el conteo de leucocitos en la leche ordeñada, además de observarse anomalías en la ubre como: hinchazón, temperatura e incluso puede llegar a gangrena, evidenciándose mastitis clínica.

La multiplicación bacteriana y la liberación de endotoxinas, que puede estar asociada con mastitis clínicas por Gram- negativos, pueden causar la liberación de mediadores inflamatorios (Riollet *et al.*, 2001). Los niveles aumentados de estos mediadores inflamatorios pueden provocar luteólisis. Se ha demostrado que los mediadores inflamatorios como las prostaglandinas, las leucotrininas, la histamina y la serotonina se incrementan en casos de mastitis experimentales inducidas por medio de infusiones intravenosas de endotoxinas de lipopolisacáridos (LPS) de Gram-negativos o por infusiones intramamarias de endotoxina de *Escherichia coli* o de *Salmonella typhimurium* o de bacterias Gram-negativas vivas (Blum *et al.*, 2000; Waller *et al.*, 2003) Por lo tanto, la

mastitis podría influir en los índices de concepción, en los índices de mortalidad embrionaria temprana y en los índices de abortos (Risco *et al.*, 1999, Barker *et al.*, 1998).

Uno de los posibles mecanismos que explicaría la reducción de la fertilidad de las vacas lecheras que desarrollan mastitis es mediante la elevación de temperatura corporal (pirexia o fiebre) ocasionada por infecciones de la glándula mamaria, provocada por bacterias gram-positivas y bacterias gram-negativas (Wenz *et al.*, 2001). Estudios *in vitro* han demostrado una menor proporción de oocitos y embriones cultivados bajo estrés por calor (Edwards y Hansen, 1997; Krininger *et al.*, 2002). Además cuando las vacas lecheras lactantes y las vaquillas lecheras estaban expuestas a estrés por calor, la tasa de fertilización y la proporción de embriones de excelente calidad fue dramáticamente inferior en vacas lecheras en comparación con novillas (Sartori *et al.*, 2002). Aparte del efecto directo de la elevación de la temperatura corporal en la calidad de los embriones, la fiebre puede afectar indirectamente el rendimiento reproductivo debido a que las vacas disminuyen la ingesta de alimentos y se afecta la condición corporal (Maltz *et al.*, 1997).

Otro posible mecanismo por el cual la mastitis puede afectar la fertilidad en las vacas lecheras es a través de la producción de sustancias que afectan la calidad y el desarrollo de oocitos, embriones, ambiente uterino y función ovárica, estas sustancias se denominan citoquinas, entre las cuales se encuentran las interleucina (IL) -1α , IL- 1β , IL-6, IL-10, IL-12 y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), fueron aisladas de células derivadas de la leche procedente de glándulas mamarias infectadas (Riollet *et al.*, 2001). Además, en vacas lactantes cuando fueron expuestas a componentes de la pared celular (lipo-polisacárido, LPS) de *Escherichia coli* dio como resultado un aumento de las concentraciones de leche de IL- 1β , IL-8 y TNF- α (Blum *et al.*, 2000; Waller *et al.*, 2003).

Estudios en vacas con mastitis demostraron que aumentan las concentraciones sanguíneas de TNF- α , IL-1 e IL-6 (Hoeben *et al.*, 2000). La mastitis también está correlacionada con aumento de las concentraciones de óxido nítrico (NO) y prostaglandina F 2α (PGF 2α) en la leche, vacas mastíticas desafiadas con oxitocina habían aumentado las concentraciones en sangre del metabolito prostaglandina F 2α (Blum *et al.*, 2000; Bouchard *et al.*, 1999; Giri *et al.*, 1984; Hockett *et al.*, 2000). Estos hallazgos indican que las infecciones de la glándula mamaria pueden dar como resultado una respuesta sistémica con la producción de compuestos que pueden alterar la fertilidad.

Existe evidencia directa de la síntesis de concentraciones luteolíticas de prostaglandinas después de una infusión de endotoxinas o una septicemia por Gram-negativos. La endotoxina de la *Salmonella enteritidis* endovenosa induce a aborto en ratones. Risco *et al.*, (1999) demostraron que las endotoxinas bacterianas causan signos clínicos dosis-dependiente variando de fiebres transitoria a abortos 24 a 48 horas después del desafío endovenoso.

La secreción de prostaglandina $F2\alpha$ ocurre al cabo de cuatro horas de la administración de la endotoxina con una disminución concomitante de las concentraciones de la progesterona en el plasma. En experimentos similares en cabras se produjo un intervalo interestro acortado y abortos. Aparentemente el resultado fue una luteólisis inducida por la endotoxina- prostaglandina $F2\alpha$. Se han reportado incrementos en la permeabilidad vascular y en las concentraciones de la prostaglandina $F2\alpha$ sérica en vacas después de infusiones intramamarias ya sea en organismos vivos o con endotoxinas (Giri *et al.*, 2002).

La mayoría de los estudios realizados para evaluar los efectos de los compuestos producidos a causa de la mastitis se desarrolló en oocitos y embriones *in vitro*, lo que significa que los estudios no se realizaron en animales vivos. Aunque los resultados de los estudios *in vitro* no siempre son observados *in vivo*, proporcionan información perspicaz sobre los posibles mecanismos por los cuales la mastitis puede afectar la fertilidad. La maduración de los oocitos bovinos en presencia de $TNF-\alpha$ dio como resultado una proporción reducida de oocitos fertilizados (Soto *et al.*, 2003). Además, los embriones cultivados en presencia de $TNF-\alpha$, prostaglandina $F2\alpha$, óxido nítrico (NO) tenían un número incrementado de células apoptóticas (células muertas) o su desarrollo estuvo comprometido en la etapa de blastocisto (Pampfer *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1999; Soto *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2001; Hobbs *et al.*, 1999). Además, la administración de prostaglandina $F2\alpha$ a las vacas suplementadas con progesterona dio como resultado embriones de pobre calidad y disminución de la tasa de preñez, lo que refuerza la idea de que la prostaglandina $F2\alpha$ puede tener un efecto directo sobre el desarrollo del embrión (Buford *et al.*, 1996).

La prostaglandina $F2\alpha$ producida por el endometrio (una de las capas de la pared uterina) es responsable de la luteólisis, que ocurre al final del ciclo estral si un embrión no está presente. Se ha demostrado que la producción de prostaglandina $F2\alpha$ puede estimularse mediante citoquinas tales como $TNF-\beta$ e $IL-1c$ (Skarzynski *et al.*, 2000; Davidson *et al.*,

1995). Por lo tanto, la mastitis puede conducir a un aumento de la secreción de prostaglandina $F2\alpha$ y, en consecuencia, luteólisis prematura, lo que podría provocar muerte embrionaria o fetal. Aunque no está claro si la mastitis podría aumentar la producción de compuestos como $TNF-\alpha$, prostaglandina $F2\alpha$ y de óxido nítrico (NO) en el tracto reproductivo, esto es posible porque la producción de estos compuestos son estimulados sistémicamente por las citoquinas.

Los ciclos reproductivos en las vacas están regulados por las hormonas producidas en el hipotálamo, hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), en la glándula pituitaria, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) y en los ovarios (estradiol y progesterona). La GnRH es responsable de estimular la secreción de FSH y LH, la hormona folículo estimulante es responsable de estimular el crecimiento inicial de los folículos en los ovarios, mientras que la hormona luteinizante es responsable de la maduración de los folículos y de la ovulación. El estradiol, producido por los folículos, es responsable de estimular el pico de LH que induce la ovulación, mientras que progesterona es responsable de estimular el crecimiento del embrión y el mantenimiento de la preñez. Por lo tanto, la interrupción de la producción o la secreción de una de estas hormonas pueden afectar drásticamente la fertilidad de las vacas lecheras. Se ha demostrado que ciertas citoquinas tales como $IFN-\beta$ disminuyen la secreción de LH (McCann *et al.*, 2000). Además, la mastitis y la exposición de las vacas a las endotoxinas producidas por bacterias gram-negativas dan como resultado un aumento de las concentraciones sanguíneas de cortisol, una hormona que bloquea la liberación y el pico de LH (Stoebel *et al.*, 1982; Li *et al.*, 1983; Padmanabhan *et al.*, 1983). La disminución o falta de secreción de LH puede dar lugar a un folículo y un oocito comprometidos en su desarrollo, falta de ovulación y función lútea subóptima. Algunas de las citoquinas producidas durante la mastitis también tienen un efecto directo sobre los ovarios, la interleucina-6, por ejemplo, bloquea la secreción de estradiol (Alpizar *et al.*, 1994), lo que puede conducir a una disminución de la secreción de LH, mientras que el $TNF-\beta$ e $IFN-\delta$ son citotóxicos para el cuerpo lúteo (Fairchild *et al.*, 1991; Petroff *et al.*, 2001) y podría causar una reducción en las concentraciones de progesterona.

Clasificación de la mastitis de acuerdo al tipo de infección:

Philpot y Nickerson (2002) clasifican a la mastitis de la siguiente forma:

1.-Mastitis Subclínica, predominante en las infecciones intramamarias; es de 15 a 40 veces más común que la mastitis clínica y no puede ser detectada a través de la observación visual de la ubre o de la leche porque presentan una apariencia normal; por lo tanto, solo puede ser detectada a través de pruebas que evidencien la presencia de los microorganismos infecciosos. Esta forma de mastitis provoca mayores pérdidas económicas por disminución de la producción y de la calidad de la leche. Es una infección de larga duración, de difícil diagnóstico y tratamiento y constituye un reservorio de la infección de otros animales del rebaño. Las vacas con mastitis subclínica no muestran ninguna señal obvia de la enfermedad y a menudo presentan una disminución en la producción, un conteo elevado de leucocitos y un aumento en el contenido de bacterias en la leche.

2.-Mastitis clínica, se caracteriza por anormalidades visibles en la ubre y leche cuya gravedad puede variar mucho durante el curso de la enfermedad; los cuartos mamarios pueden estar rojizos, inflamados y endurecidos a la palpación. Las anormalidades visibles de la leche varían de coágulos a flóculos además de secreciones como suero o sanguinolentas. Generalmente, la mastitis clínica es provocada por patógenos de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Coliformes*. Se considera que no debe existir más de 0,5% del total del hato con mastitis clínica en tratamiento, el descarte por mastitis por año no debe ser mayor del 3% y las muertes por mastitis no deben superar el 1% del hato al año (Philpot y Nickerson ,2002).

Clasificación de mastitis de acuerdo a su nivel de gravedad

1.-Mastitis clínica subaguda: es una forma de inflamación moderadamente clínica; se producen pequeñas alteraciones en la leche como coágulos, flóculos pequeños o adquiere una apariencia acuosa, decolorada. El cuarto afectado puede estar levemente inflamado, sensible al toque, puede haber o no inflamación local y reducción de la producción sin que presente problemas sistémicos.

2.-Mastitis clínica aguda: se caracteriza por el aparecimiento súbito de síntomas: la ubre está rojiza, inflamada, endurecida y sensible al tacto. La leche tiene un aspecto anormal purulento, de suero aguado o sanguinolento y la producción se reduce drásticamente. Al padecimiento se suman signos sistémicos como: postración, diarrea, pulso acelerado, disminución de la función ruminal, temblores y depresión.

3.- Mastitis clínica hiperaguda: este tipo de inflamación es rara; se caracteriza por un desarrollo muy rápido; los síntomas presentados son los mismos que en el caso de la mastitis clínica aguda, pero este caso es mucho más grave por los síntomas adicionales que incluyen: fiebre, choque, fibrosis de la ubre, septicemia, extremidades frías, reducción del reflejo pupilar.

5.- Mastitis crónica: esta forma de infección es de larga duración y se puede establecer como cualquier otra de las formas clínicas previamente descritas o puede iniciarse con una infección subclínica, con aparecimientos clínicos repentinos e intermitentes; los síntomas son de desarrollo progresivo de tejido fibroso, alteraciones en tamaño y forma del tejido y reducción del rendimiento de la producción de leche.

6.-Mastitis No Específica: también se la conoce como mastitis aséptica o mastitis no bacteriana; se caracteriza por el aumento del conteo de células somáticas mas no se aísla ningún microorganismo causal en las muestras de leche; puede ser originada a causa de traumas físicos en la glándula mamaria, irritaciones químicas, por el uso de productos para el tratamiento de mastitis o por el inadecuado funcionamiento de los equipos de ordeño. Este tipo de mastitis puede ser de naturaleza clínica o subclínica. *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus agalactiae* es aislado de un cuarto con o sin aumento de células somáticas; en este caso, las bacterias aisladas representan apenas una colonización del canal del pezón pero no caracterizan una infección intramamaria propiamente dicha.

Pruebas para la detección de mastitis:

Según Philpot y Nickerson (2002), dentro de los exámenes para detectar mastitis tenemos:

Exámenes físicos: se realizan mejor cuando la ubre de la vaca está vacía inmediatamente después del ordeño; se examina para detectar los cuartos endurecidos,

hinchados y calientes así como cuartos atrofiados o deformes con áreas de tejido cicatrizante que indican daños permanentes.

Prueba de despunte: examinando los primeros chorros de leche con un despuntador o jarro de fondo oscuro, se puede detectar clínicamente la leche anormal que no debe enviarse al tanque. Además sirve para identificar vacas con mastitis que necesitan tratamiento.

Prueba de Mastitis de California (CMT): La Prueba de California para Mastitis, por sus siglas en inglés ha sido empleada durante décadas y sigue siendo la prueba más utilizada a nivel de campo para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero (Morresey, 1999; Radostits, 2000; Medina y Montaldo, 2003; Erskine, 2001; Bedolla, 2004b). Es una prueba sencilla que es útil para detectar la mastitis subclínica por valorar groseramente el recuento de células de la leche. No proporciona un resultado numérico, sino más bien una indicación de si el recuento es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso (Blowey y Edmonson, 1995; Bedolla, 2004b). Estima el contenido de células somáticas en la leche y para que los resultados sean confiables, la prueba debe realizarse justo antes del ordeño después de realizar la descarga de los primeros chorros de leche. Según, Mellenberger (2000) normalmente la leche de una glándula mamaria sana tiene menos de 100.000 ccs/ml, donde el 80% de las células son macrófagos y el 20% o menos corresponden a neutrófilos. A pesar de tener alta sensibilidad la prueba de CMT presenta deficiencias en especificidad, dando falsos positivos durante la primera semana después del parto; en vacas que tienen más de siete meses de producción y varios partos, en estos casos el grado de viscosidad va a ser similar en los 4 pezones (Mellenberger, 2000). La prueba de California Mastitis Test es la reacción de un compuesto químico que rompe las células (lisador) y deja salir su ADN fuera de la membrana celular, estos filamentos de ADN tienen tendencia a formar unas estructuras tipo gel cuando se unen unos con otros (Philpot y Nickerson, 2002). A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación (Smith 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003). Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma

al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente (Smith 1990; Saran y Chaffer, 2000; Medina y Montaldo, 2003).

La prueba consiste, en descartar los primeros chorros de leche de cada pezón para evitar falsos positivos, se coloca 2 ml de leche de cada pezón en la pateta de CMT y se adiciona una cantidad proporcional de reactivo, se homogeniza y se procede a realizar la lectura; en caso de positividad el reactivo de CMT reacciona con el ADN celular formando un gel característico dando los siguientes grados de positividad: traza, uno, dos, tres (Zurita, et al. 1982).

Según, Ruiz (1996) la interpretación se la debe realizar de acuerdo al grado de mastitis que presenta, así:

Negativo: No hay precipitado por lo tanto no hay infección.

Trazas: Existe ligera precipitación que desaparece al agitar, se forma una especie de velo en el pocillo de la paleta, se recomienda comparar el resultado de un cuarto de la glándula con la otra.

Grado 1: Existe una ligera agitación con algunos filamentos grumosos, al mover la paleta por unos 20 segundos los grumos tienden a desaparecer, presenta una apariencia de gelatina ligera.

Grado 2: Toma la apariencia de una clara de huevo, toma consistencia de moco y cae el precipitado en el pocillo de forma lenta, este grado corresponde a una infección seria.

Grado 3: Se produce la formación de una especie de coagulo, que se queda adherido a la paleta que cae muy lento y este no pierde la forma a pesar de la agitación, este grado corresponde a una infección seria.

La técnica diagnóstica es ampliamente difundida y utilizada a nivel mundial, según un estudio realizado por Ferrano ,*et al.*, (1999), la prueba California Mastitis Test tiene una sensibilidad de 0.76, especificidad 0.56, por lo tanto los resultados obtenidos estiman prevalencia aparente.

Conteo de Células Somáticas: se realiza con la mezcla de la leche de todos los cuartos de cada vaca; permite evaluar el estado de salud de la ubre y deficiencias en el control de mastitis, al igual que la prueba de CMT, no permite realizar un tratamiento sin un cultivo. Los valores del conteo de células somáticas en casos de ausencia de infección mamaria oscilan entre 200000- 300000 ccs/ml, mientras que recuentos superiores a 800000 ccs/ml se asocian a infecciones persistentes, en el caso de cuartos normales existe menos de 100000 ccs/ml (Cerón, *et al.*, 2007).

Un cuarto sano de la glándula mamaria mantiene un nivel de células somáticas menor de 100000 ccs/ml (Wolter *et al.*, 2004). Con el establecimiento de procesos inflamatorios de la glándula mamaria se estima que el contaje sobrepasa 500000 ccs/ml. Hatos con 400000 ccs/ml poseen buenas prácticas de manejo, pero no controlan mastitis (Cerón, *et al.*, 2007).

Las glándulas mamarias que nunca se han infectado normalmente tienen CCS de 20,000 a 50,000 ccs/ml. En grandes poblaciones de vacas, 80% de los animales no infectados tendrán un CCS menor de 200,000 células/ml y 50% menor de 100,000 células/ml. Una razón de las cuentas ligeramente elevadas en animales no infectados es que algunos cuartos tuvieron una infección previa de la cual no se han recuperado totalmente (Philpot, 2001).

Tabla 1.1 Relación entre grado de CMT y Rango de Células somáticas.

Relación del Grado de CMT y Rango de Células Somáticas	
Grado de CMT	Rango de células somáticas
Negativo	< 200000
Trazas	200001-400000
Grado 1	400001-1500000
Grado 2	1500001-5000000
Grado 3	> 5000000

Fuente: Ruiz; 1996.

Conductividad Eléctrica: detecta la mastitis basada en los diferentes niveles de concentración de sal que ocurren entre los cuartos infectados y sanos de la misma vaca, puesto que la presencia de bacterias aumenta el sodio y el cloro en la leche, disminuyendo los iones de calcio y la lactosa.

Cultivos de muestras de leche: es un procedimiento en el que se lleva a un microorganismo a un medio artificial con condiciones adecuadas para su crecimiento y así conocer su comportamiento e identificarlo; debe reunir condiciones de temperatura, humedad, presión osmótica y pH. Las muestras de los casos clínicos o de cuartos con altos conteos de células somáticas que no presentan crecimiento, puede obedecer a que ciertas bacterias como coliformes en infecciones crónicas tienen un número de bacterias muy bajo para ser detectados; en otros casos se pudo haber eliminado la infección, pero existe un elevado número de células somáticas que persisten mientras se completa la curación, también se puede considerar la posibilidad de la presencia de un microorganismo que no crece en medios normales como *Mycoplasma spp.*

Análisis de muestra de tanque: para detectar la mastitis a nivel del hato, se puede hacer un estudio del conteo total de células somáticas y de los tipos de bacterias en el tanque de leche. Un rango de más de 200 000/ml células somáticas sugiere la presencia de mastitis en el hato pero revela muy poco sobre casos clínicos de mastitis, el grupo de vacas envuelto o clases de infecciones presentes.

Reconocimiento materno de la gestación

La duración del ciclo estral en la vaca está determinado principalmente por la duración del cuerpo lúteo (CL) (Thatcher, *et al.*, 1995; McCracken *et al.*, 1999). Mientras que en animales que se encuentran ciclando la regresión del cuerpo lúteo es necesaria para el retorno al estro, en animales preñados el proceso de luteólisis debe ser bloqueado para mantener la gestación. La luteólisis es el resultado de la secreción pulsátil de prostaglandina F_{2α} por parte del endometrio, la cual está regulada por una precisa y coordinada regulación en la expresión de receptores de oxitocina, estradiol y progesterona (Robinson *et al.*, 2001). Durante las primeras etapas de desarrollo embrionario (días 14 a 25), el blastocito en elongación envía la señal para evitar el desencadenamiento del proceso de luteólisis y por lo tanto permitir el establecimiento de la preñez, este proceso se conoce como reconocimiento

materno de la preñez (Roberts *et al.*, 1999; Thatcher *et al.*, 1995). Esta señal está mediada por la liberación de interferón tau (INFt) por parte de las células mononucleares del trofoblasto (Roberts *et al.*, 1999; Thatcher *et al.*, 1995; Spencer *et al.*, 2002). El efecto antiluteolítico del INFt está dado por su capacidad de bloquear la expresión de receptores de oxitocina en el epitelio luminal y el epitelio glandular superficial del endometrio impidiendo la liberación pulsátil de prostaglandina F2 α (Thatcher *et al.*, 1995; 2001). Al impedir la liberación pulsátil de prostaglandina F2 α se bloquea la luteólisis ya que la regresión luteal sólo tiene lugar cuando un cuerpo lúteo funcional es expuesto a un patrón de secreción pulsátil de prostaglandina F2 α (Kindahl *et al.*, 1976; Silvia *et al.*, 1991). De hecho, el proceso de desarrollo embrionario en sí crea un ambiente de elevadas concentraciones basales de prostaglandinas, las cuales son necesarias para el crecimiento y expansión del embrión (Dorniak *et al.*, 2013). Estudios recientes han sugerido que aparte de su conocida acción parácrina, el INFt podría estar actuando de manera endócrina para prevenir la luteólisis (Bott *et al.*, 2010; Antoniazzi *et al.*, 2013). El aumento en la expresión de genes en los leucocitos en circulación en respuesta al INFt durante el reconocimiento materno de la preñez brinda apoyo a la hipótesis sobre un efecto endócrino del mismo (Yankey *et al.* 2001; Han *et al.*, 2006; Gifford *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2010). Este grupo de genes es conocido como Genes Estimulados por el Interferón o ISGs por sus siglas en inglés; dentro de éstos se encuentran el ISG15 (Han *et al.*, 2006; Gifford *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2010), MX1 y MX2 (Yankey *et al.*, 2001; Stevenson *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2010) y OAS (Green *et al.*, 2010). El hecho de que su expresión aumente significativamente en las vacas preñadas durante el período de reconocimiento materno de la preñez los convierte en una potencial herramienta de diagnóstico temprano de preñez (Han *et al.*, 2006; Gifford *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2010). Las concentraciones plasmáticas de INFt en rumiantes son muy bajas (Oliveira *et al.*, 2008; Bott *et al.*, 2010), lo que hace que sea muy difícil su detección y actualmente no existe un análisis de laboratorio disponible. Por esta razón, la determinación de incrementos en la expresión de los ISGs se ha convertido en una herramienta muy utilizada en investigación para determinar la presencia de un embrión durante el período de reconocimiento materno de preñez y ha sido evaluado como herramienta de diagnóstico precoz de preñez (Han *et al.*, 2006; Stevenson *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2010). También es importante mencionar que es posible detectar la presencia de un concepto alrededor del día 25 de la gestación mediante la detección de 184 glicoproteínas asociadas a la preñez (PAGs)

en plasma; éstas son una familia de glicoproteínas producidas y liberadas al torrente sanguíneo materno por las células binucleadas de la placenta (Wooding *et al.*, 2005). Dentro de ésta familia de glicoproteínas, la proteína específica de la preñez B (PSPB) es una de las más comúnmente utilizadas para el diagnóstico temprano de gestación (Zoli *et al.*, 1992; Green *et al.*, 2005).

Pérdidas de preñez en bovinos

La falla reproductiva en vacas lecheras inseminadas es el resultado de la mala fertilización y supervivencia embrionaria. Estudios con vacas lecheras en lactancia indican que la tasa de fertilización tuvo un promedio de 76,2 % y vario entre 55,3 y 87,8% (Santos *et al.*, 2004a). Una vez fertilizado el ovocito, el destino de la preñez se determina por la supervivencia del embrión y del feto. La incidencia de la pérdida de preñez en ganado lechero varía con el momento del diagnóstico de la preñez. Lamentablemente poco se sabe sobre los factores de riesgo de pérdidas de preñez durante los primeros 25 a 28 días de gestación, debido a la falta de un método de diagnóstico de preñez no invasivo y certero para detectar preñeces antes del día 25. Estudios de vacas de carne en lactancia sugieren que la tasa de fertilización tuvo un promedio de 75 % y varió entre el 60 y 100 % (Santos *et al.*, 2004a). En algunos estudios, la menor tasa de fertilización en vacas de carne puede haber estado relacionada con inseminaciones realizadas en el posparto temprano, cuando la anovulación y el anestro prevalecieron en vacas de carne. A pesar de la escases de datos para confirmar que las vacas estaban en el posparto temprano, es posible que las tasas de fertilización en vacas de carne en lactancia no sean tan altas como se pensaba y el promedio de 75 % representa la verdadera tasa de fertilización en vacas con cría a la inseminación artificial.

Las pérdidas de preñez pueden caracterizarse como muerte embrionaria temprana que ocurre antes del reconocimiento materno de la preñez, muerte embrionaria tardía, que ocurre entre los días 24 y 42 de gestación y muerte fetal, que ocurre después del día 42. Se supone que la frecuencia de pérdidas de preñez es mayor durante el periodo embrionario temprano que puede demostrarse por el uso de transferencia de embriones. Cuando se transfirieron embriones de 2 días a vacas receptoras y luego se recuperaron por flushing uterino 9 días más tarde, sólo se recuperó 55 al 60 % de los conceptus (Bertolini *et al.*, 2002).

En vacas lecheras en lactancia, la transferencia de embriones frescos o congelados /descongelados da tasas de preñez que son pocas veces mayores al 50 % lo cual indica que la pérdida embrionaria temprana puede afectar a más del 50 % de los oocitos fertilizados. Para la inseminación artificial, las pérdidas embrionarias tienen más preponderancia que las pérdidas fetales. Si se las considera juntas, las pérdidas fetales y embrionarias pueden llegar a más del 60 % de las gestaciones.

Las pérdidas de preñez pueden caracterizarse por muerte embrionaria o fetal. La mayoría de los productores reconoce las pérdidas de preñez cuando el feto es expulsado del útero de las vacas preñadas. Sin embargo, se calcula que la mayoría de las pérdidas ocurren durante los primeros 50 días de gestación, durante el periodo embrionario. La luteólisis y el retorno al estro antes del día 24, podría indicar pérdida embrionaria que sucede después del día 16 de la gestación. Por lo tanto, las pérdidas de preñez antes del día 24 después de la inseminación artificial indican pérdidas embrionarias tempranas y aquellas entre los días 24 y 50 indican pérdidas embrionarias tardías, las pérdidas de preñez detectadas después del día 50 caracterizan las pérdidas fetales (Humbolt , 2001).

Prevalencia de pérdidas de preñez

Sartori *et al.* (2002) colectaron embriones el día 6 después de la ovulación de vacas lecheras en lactancia y observaron que solo el 33,3 y 52,8 % fueron considerados viables cuando las vacas estuvieron expuestas a estrés calórico o a neutralidad térmica, respectivamente. Según sus resultados cuando el estrés calórico está presente, más del 45 % de las preñeces se perdieron para el día 7 de gestación.

Vasconcelos *et al.* (1997) evaluaron la preñez en varios intervalos después de la inseminación artificial. De las primeras preñeces el día 28 después de la inseminación artificial, 89,5% ;83,8% ;82,4 % y 80,9 % permanecieron preñadas los días 42, 56 ,70 y 98 de la gestación respectivamente. Santos *et al.* (2004) resumieron información de varios experimentos y observaron que el riesgo de pérdida de preñez era mucho mayor al comienzo de la gestación que hacia el final. Por lo tanto, las pérdidas embrionarias tempranas tienen mayor preponderancia que las tardías que, a su vez, tienen mayor preponderancia que las pérdidas fetales. En las vaquillonas, las pérdidas fetales y embrionarias en bovinos lecheros suelen ser bajas y tienen un promedio de 4,2 % (Santos *et al.*, 2004a).

Pérdida de preñez temprana

Los cálculos de tasa de fertilización en vacas lecheras en lactación van desde 55,3 % durante el verano hasta casi el 87,8 % durante los periodos de neutralidad térmicas (Sartori *et al.*,2002). Sin embargo, las tasas de concepción 21 a 31 días luego de la inseminación suelen ser menores al 50 % en vacas lecheras en lactación. Además, cuando se transfieren embriones de 6 a 7 días a vacas lecheras en lactación, sólo del 35 al 45 % de las vacas continuaban preñadas 22 días más tarde. Por lo tanto, se registra una pérdida de preñez después de la inseminación y dicha pérdida puede representar hasta el 40 % de los oocitos fertilizados.

Factores de riesgo

Los factores de riesgo comunes relacionados con una menor fertilidad en bovinos son: anomalías del oocito relacionadas con una menor calidad debido al estrés o a una dominancia prolongada, menor desarrollo embrionario y una señal de reconocimiento de preñez comprometida, anestro posparto prolongado, enfermedades periparturientas y uterinas, enfermedades infecciosas, pérdida excesiva de score de condición corporal durante el posparto temprano, estrés calórico y mayor número de partos (Santos *et al.*, 2004a).

Calidad del oocito

La calidad de los gametos femenino y masculino es un factor importante que participa en la tasa de fertilización y en el desarrollo del cigoto recién formado. Estudios diferentes mostraron los efectos negativos de los oocitos de mala calidad sobre la tasa de fertilización, el desarrollo embrionario y la tasa de concepción. La supervivencia embrionaria se reduce si los embriones provienen de oocitos de vacas con folículos de dominancia prolongada, dietas con gossipol o que dan altas concentraciones de urea y amoníaco en la sangre o la exposición al estrés calórico. Debido a que puede llevar entre 40 y 50 días para que un folículo se desarrolle hasta el estado de ovulatorio (Webb *et al.*,2004) los eventos que ocurren en los meses anteriores a la ovulación pueden influir sobre la fertilización y la supervivencia embrionaria temprana.

Folículo persistente

La ovulación de folículos viejos tiene como resultado oocitos de menor calidad. Revah y Butler (1996) compararon la calidad del complejo *cumulus oophorus* de folículos recuperados el día 13 del ciclo estral y los folículos en la etapa de crecimiento recuperados el día 7. El complejo *cumulus oophorus* de folículos de 13 días tenía características degenerativas mientras el complejo *cumulus oophorus* de los folículos de 7 días estaba intacto. La larga exposición del complejo *cumulus oophorus* a concentraciones crecientes de LH provoca una maduración prematura del oocito (Mihm *et al.*, 1999) y tasas de concepción reducidas (Austin *et al.*, 1999). La supervivencia embrionaria temprana se vio comprometida cuando las vacas inseminadas ovularon un folículo persistente en comparación con las vacas que ovularon un folículo en crecimiento (Ahmad *et al.*, 1995). Del mismo modo, a medida que se prolongó el periodo de dominancia, la calidad embrionaria el día 6 se vio comprometida (Cerri *et al.*, 2005). Estos resultados indican que los factores que provocan la dominancia del folículo ovulatorio pueden comprometer el desarrollo embrionario temprano lo cual probablemente provoque una mayor cantidad de pérdida embrionaria.

Desbalances endocrinos

Desbalances endocrinos, específicamente niveles anormales de la concentración plasmática de progesterona y estrógenos pueden causar mortalidad embrionaria y fetal (Ayalon, 1978). El desarrollo folicular es regulado localmente y existe una disminución del crecimiento folicular en el ovario ipsilateral al cuerno gestante durante los primeros dos meses de gestación (Thatcher *et al.*, 2003). El día 17 post celo se observa un incremento del receptor alfa estrogénico, un incremento del ARN mensajero para el receptor de oxitocina y una disminución de la expresión del receptor de progesterona en las glándulas uterinas de vacas cíclicas que no se observa en vacas preñadas (Thatcher *et al.*, 2003). Las vacas lecheras de alta producción pueden mostrar bajos niveles de progesterona durante la fase luteal debido a un mayor flujo sanguíneo hepático que resulta en una mayor tasa metabólica de las hormonas esteroideas (Sangsritavong *et al.*, 2002) y esto podría contribuir a incrementar las pérdidas embrionarias. Además, estos valores bajos de progesterona van a resultar en una

mayor pulsatilidad de LH durante el diestro y estimular el crecimiento folicular. Un excesivo crecimiento folicular y altos niveles de estradiol durante la fase luteal también pueden ser nocivos para la supervivencia del embrión (Pritchard *et al.*, 1994, Inskoop, 1995). Otros factores tales como estrés calórico (Wolfenson *et al.* 1995), alta producción de leche y somatotrofina bovina (de la Sota *et al.*, 1993) afectan la dominancia folicular lo que puede resultar en un mayor desarrollo folicular durante la gestación. Es notable que el crecimiento folicular está suprimido o reducido en el ovario ipsilateral al cuerno gestante durante el período embrionario tardío (Guibault *et al.*, 1986, Thatcher *et al.*, 1986, Thatcher *et al.*, 2001). Por lo tanto, la supresión farmacológica del crecimiento folicular podría ser beneficiosa para la supervivencia del embrión.

Estrés Calórico

Las vacas lecheras en lactancia son muy sensibles al estrés calórico. La alta producción de leche está relacionada con la mayor ingesta de alimentos y la tasa metabólica, lo cual compromete los mecanismos de termorregulación de la vaca. Zeron *et al.*, (2001) evaluaron la competencia de desarrollo y la composición de la membrana de los oocitos expuestos al estrés calórico. La exposición a altas temperaturas provocó una menor producción de estradiol e inhibina en los folículos y una menor tasa de clivaje y desarrollo hasta el estado de blastocito. Los oocitos colectados durante el verano presentaron una morfología empeorada que podría haberse debido a cambios en el perfil de ácidos grasos en el oocito. A pesar de que el estrés calórico afecta la fertilización, la supervivencia embrionaria y fetal temprana y tardía (Cartmill *et al.*, 2001; Chebel *et al.*, 2004; Sartori *et al.*, 2002), es durante los estadios tempranos de la gestación, desde la fertilización hasta las divisiones celulares tempranas, que altas temperaturas tienen los efectos más perjudiciales.

En un estudio realizado por Sartori *et al.*, (2002) se demostró que las vacas en lactancia en condiciones de estrés calórico tienen menores tasas de fertilización que las vacas nulíparas y las vacas en lactancia expuestas a temperaturas neutras. Se pensaba que esto estaba relacionado con la calidad de los oocitos porque la cantidad de los espermatozoides accesorios era similar entre embriones y oocitos fertilizados. Además los embriones producidos por vacas en lactancia en climas cálidos fueron de menor calidad que los embriones producidos por vacas en lactancia en temperaturas neutras (Sartori *et al.*, 2002).

Drost *et al.*, (1999) demostraron que la transferencia de embriones producidos *in vivo* de vacas expuestas a temperaturas neutras aumentó las tasas de preñez en vacas en condiciones de estrés calórico a comparación de la inseminación artificial. Esto demuestra que los efectos negativos del estrés calórico pueden comprometer la calidad del oocito, la fertilización y desarrollo embrionario temprano, reduciendo así las posibilidades de preñez.

Estado de ciclicidad

Rhodes *et al.*,(2003) indicaron que entre el 11 y 38 % de las vacas en sistemas de producción de parición durante todo el año siguen siendo anovulatorias a los 50 a 60 días posparto mientras entre el 13 y 43 % de las vacas en sistemas de pasturas son anovulatorias antes de comenzar la temporada de servicio. Rutigliano y Santos (2005) evaluaron el estado de ciclicidad en 5767 vacas lecheras en lactancia durante los primeros 65 días posparto y observaron que las vacas multíparas tenían 2,1 menos posibilidades de ciclar que vacas primíparas (81,9 vs 69,5 % ; $P < 0,001$). En esa población de vacas Holstein de cinco rodeos lecheros, el 22,5% de las vacas permanecían anovulatorias el día 60 posparto. Es interesante notar que aunque las vacas ovularon después de un periodo de anovulación o anestro, la fertilidad fue baja. Estas vacas suelen tener malas tasas de inseminación después de un periodo de espera voluntaria cuando se utilizan sistemas de detección de celo (Gumen *et al.*,2003). Cuando participaron de un programa de inseminación artificial a tiempo fijo con GnRH, la mayoría de las vacas anovulatorias experimentaron una ovulación sincronizada pero las tasas de concepción permanecieron bajas (Gumen *et al.*,2003). La fase luteal posparto puede ser de corta duración (< 12 días), generalmente asociada con la falta de exposición previa a la progesterona o a cantidades suficientes de estradiol durante el proestro (Inskeep, 2002). Las menores concentraciones plasmáticas de progesterona en el ciclo estral anterior provocó una liberación prematura de PGF2 α en el ciclo siguiente (Shaham-Albalancy *et al.*,2001). Por lo tanto, la anovulación presenta un riesgo para lograr y mantener una preñez en bovinos.

Rutigliano y Santos (2005) evaluaron el riesgo de pérdida embrionaria tardía en vacas lecheras en lactancia clasificadas como cíclicas o anovulatorias a los 65 días posparto y sujetas a sincronización de celo u ovulación para la primera inseminación posparto. Observaron que las vacas anovulatorias tenían 1,3 más posibilidades de perder una preñez que las vacas cíclicas. Santos *et al.* ,(2004) revisaron varios estudios con vacas lecheras de

alta producción y observaron que el 15,7 y el 26,3 % de las preñeces se perdían en vacas cíclicas y anovulatorias respectivamente. Las vacas anovulatorias tuvieron 2,01 más posibilidades de pérdida de preñez que las vacas cíclicas (OR = 2,01;95 % intervalo de confianza 1,41; 2,88; P < 0,001). De igual modo, en Nueva Zelanda, con vacas lecheras en un sistema de pastura, las vacas clasificadas como anestro al comienzo de la temporada de servicio tuvieron una menor tasa de preñez y mayor riesgo de pérdida de preñez. De hecho, el riesgo de pérdida de preñez aumento 1,6 veces en animales que estaban en anestro comparado con vacas cíclicas.

Condición corporal

López *et al.*,(2002) indicaron que una caída de 1 unidad de escore de condición corporal en una escala de 1-5 desde el parto hasta los 30 días posparto aumentó el riesgo de pérdida de preñez 2,41 veces. Silke *et al.*, (2002) observaron que las vacas que perdieron 1 unidad de condición corporal entre los días 28 y 56 de la gestación tuvieron 3,2 veces más riesgo de pérdida de preñez en el mismo periodo. Estos datos indican que el estado metabólico de la vaca, según lo reflejado en la condición corporal, afecta la supervivencia fetal y embrionaria. Por lo tanto, se espera que los programas de salud y nutrición durante la gestación tardía y la lactancia temprana que minimizan la movilización de los tejidos mejoran el mantenimiento de la preñez en vacas lecheras en lactancia.

Programas de sincronización

La baja tasa detección de celos en tambos comerciales a llevado al uso de protocolos de sincronización de la ovulación y del celo. Estos programas se basan en combinación de hormonas como la GnRH y la PGF2 α en el caso de protocolos Ovsynch y CoSynch, que sincronizan la emergencia de una nueva onda folicular, causan la regresión luteal y sincronizan el desarrollo final y la ovulación de folículos dominantes. Otros programas de sincronización de celo o de ovulación también podrían incorporar el uso de dispositivos intravaginales con progesterona. Se ha sugerido que las pérdidas de preñez pueden haber aumentado con el uso de programas de sincronización de la ovulación (Lucy,2001). Muchos estudios comparan las pérdidas embrionarias tardías en vacas lecheras en lactancia cuando se las insemina luego de una ovulación o un celo sincronizado. Las vacas en lactancia inseminadas con un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo (Ovsynch) tuvieron

pérdidas de preñez similares entre el día 31 y 45 después de la inseminación artificial en comparación de vacas inseminadas después del celo espontáneo (10,4 vs 13,2% ; Chebel *et al.*, 2004). Cuando Santos *et al.* ,(2004a) resumieron seis estudios , solo uno mostró una tendencia en aumentar la pérdida de preñez en vacas inseminadas después de la inseminación artificial a tiempo fijo a comparación del tratamiento de sincronización de celo (Cartmill *et al.*, 2001).Es interesante mencionar que cuando se inseminaron las vacas luego de signos secundarios de celo con detectores de monta o luego de la inseminación a tiempo fijo después de un solo tratamiento con PGF2 α , el riesgo de aborto aumento 1,7 veces a comparación de vacas inseminadas después de detectar celo por observación visual de la actividad de monta (Risco *et al.*, 1999). Por lo tanto cuando están bien implementados, es poco probable que los protocolos de sincronización aumenten el riesgo de pérdidas de preñez en vacas lecheras.

Enfermedades

Se ha informado que muchas enfermedades reducen la tasa de concepción lo cual indica una menor fertilización o una mayor pérdida embrionaria temprana y tardía. A pesar que las enfermedades reducen la fertilidad en bovinos, se desconoce cuál es la etapa de la preñez más afectada por enfermedades actuales o antiguas. Cerri *et al.*, (2006) informaron que las vacas con endometritis subclínica, diagnosticadas por un aumento de neutrófilos en el útero mostraron tasas de fertilización menores. Resulta claro que la endometritis clínica (McDougall *et al.*,2005;Galvão *et al.*,2006a) y subclínica (Galvão *et al.*, 2006a;Gilbert *et al.*,2005) reducen las tasas de concepción en bovinos y es probable que sea el resultado de supervivencia embrionaria y fertilización reducida. La lista de agentes patógenos podría ser innumerable y por consiguiente se van a resaltar los que puedan tener más relevancia en nuestro medio. Dentro de ellos están, tricomoniasis, leptospirosis, diarrea viral bovina, IBR (BonDurant, 2007).

Tricomoniasis: es una enfermedad venérea que altera la calidad del endometrio (endometritis-piómetra) y puede generar muerte embrionaria por un mal ambiente uterino. También se ha reportado que el parásito puede quedar dentro del embrión al momento de la eclosión, y después de múltiples replicaciones generar aborto por daño directo al feto. Sin embargo esta última forma de infección sería menos frecuente. Como es una enfermedad venérea, su control está dirigido al control de los portadores del parásito, el toro. Se deben identificar los toros positivos y eliminarlos del hato. Se requieren al menos tres cultivos

negativos realizados con intervalo de una semana para certificar un toro como negativo a tricomoniasis (BonDurant, 2007).

El control de las vacas afectadas es más complicado debido al impacto económico que implicaría descartar todas las vacas expuestas. Las vacas se deben separar por grupos, un grupo de más de 5 meses de gestación (probabilidad de aborto baja) y un grupo de menos de 5 meses de gestación (probabilidad de aborto alta). Las vacas vacías se deben separar en vacas con piómetra o con anormalidades uterinas y vacas aparentemente normales. A pesar de que es posible que las vacas con anormalidades uterinas se “curen”, el daño endometrial es tan severo que muchas veces las vacas no preñan y van a ser descartadas por infertilidad.

Por consiguiente las vacas con las anormalidades se deben eliminar del rebaño, además porque son un riesgo de contaminación para los toros. La recomendación final para esta enfermedad es que los toros que se deben introducir a un hato deben ser vírgenes y no debe rotarse por diferentes hatos cuyo estatus sanitario sea desconocido (BonDurant, 2007).

Leptospirosis: esta enfermedad es causada por *Leptospira borgpetersenii*, serovar *hardjo*, tipo *hardjobovis*. Se han detectado varios tipos de leptospira sin embargo se considera que en el bovino, la patógena es *borgpetersenii*. Esta diferenciación es importante porque los esquemas vacunales no han sido eficaces en la prevención de la enfermedad, posiblemente porque se está vacunando con el patógeno inadecuado. La leptospirosis causa comúnmente aborto entre el segundo y tercer mes de gestación, pero también puede ser causal de muerte embrionaria y de infertilidad. La bacteria entra a través de las membranas mucosas y persiste en el riñón y el tracto reproductivo. Estos animales son portadores y diseminadores importantes de la enfermedad pero además tienen afectado su potencial reproductivo (BonDurant, 2007). El control de la enfermedad no es fácil debido a que las vacas portadoras eliminan constantemente la bacteria y además la reinfección en las condiciones del trópico son muy altas. El control de la enfermedad se basa en programas de vacunación, control de los factores de riesgo (roedores, aguas estancadas) y en la eliminación del estado portador de las vacas a través de tratamientos (BonDurant, 2007).

Diarrea Viral Bovina (DVB): el virus de la DVB puede afectar la gestación en cualquiera de sus etapas. Durante la gestación temprana (menos de 4 meses) el virus es generalmente letal. El sistema de transmisión más importante parece ser a través de los animales persistentemente infectados o PI. Estos diseminan la enfermedad en todo el hato

de una manera muy eficiente y con prevalencia alrededor del 70% (BonDurant, 2007). Cuando un animal se infecta, el virus se va a ubicar preferentemente en el tacto reproductivo, empezando por los ovarios. El virus genera ooforitis alterando la concepción de la vaca al afectar la calidad del oocito, la capacidad esteroidogénica del folículo y la formación del cuerpo lúteo. Si el embrión eclosiona, el virus es letal una vez se replica en el individuo. Después de los 120 días, el feto puede sobrevivir a la infección y generarse el estado de PI. Se deben instaurar programas de bioseguridad para evitar la entrada de animales PI al hato. Los programas vacunales son importantes para reducir el riesgo de infección, sobre todo en fincas abiertas (BonDurant, 2007).

Rinotraqueitis bovina (IBR): El virus del IBR también afecta la viabilidad de la gestación en todas sus etapas. Causa ooforitis generando repetición de calores, muerte embrionaria y abortos. Es una enfermedad fácil de diagnosticar por serología y las vacunas que se encuentran en el mercado son buenos inmunógenos. Si el diagnóstico de la enfermedad es adecuado, una implementación apropiada de programas de control incluyendo la vacunación con las diferentes cepas comerciales, generalmente ofrece una respuesta inmediata en cuanto a la disminución de los problemas de fertilidad y de aborto en las vacas (Nandi *et al.*, 2009).

Mastitis

La mastitis bacteriana puede ser causada por organismos gram-negativos o gram-positivos. Los primeros liberan endotoxinas de sus paredes celulares que contienen lipopolisacaridos y pueden inducir una liberación endógena de prostaglandina F_{2α}. Similar a la gram negativa, la bacteria gram positiva puede provocar respuestas inflamatorias, pirexia y shock séptico. La mastitis clínica o subclínica, está asociada con menores tasas de concepción en bovinos lecheros (Shrick *et al.*, 2001).

Uno de los primeros estudios para demostrar una correlación entre la aparición de mastitis y la alteración de parámetros reproductivos en vacas lecheras fue realizado por Moore *et al.* (1991). El estudio se realizó en dos hatos lecheros Holstein, las vacas se clasificaron como aquellas que experimentaron y no experimentaron mastitis entre las inseminaciones artificiales (IA) o estro. Las vacas del rebaño 1 se vieron afectadas por

Staphylococcus aureus (bacterias gram-positivas), mientras que las vacas en el rebaño 2 se vieron afectadas por la mastitis coliformes (bacterias gram-negativo) El parámetro que evaluaron fue el intervalo inter-estro, las vacas se clasificaron al tener un intervalo anormal cuando el retorno a estro era menor de 18 días o mayor a 24 días. Este parámetro se utilizó como un indicativo de mortalidad embrionaria temprana o de función lútea alterada. Aunque no hubo efecto de la mastitis en el intervalo interestro en el rebaño 1, las vacas del rebaño 2 fueron más propensas a tener un intervalo interestro alterado en comparación con vacas que no experimentaron mastitis (Moore *et al.*, 1991). Estos hallazgos observados en las vacas del rebaño 2 que presentaron mastitis por bacterias gram-negativas, podrían haber afectado el intervalo inter-estro a través de una endotoxemia, que a su vez ocasionó fiebre y secreción sistémica de hormonas (prostaglandina F_{2α} y cortisol) que afectaron la función del ovario y del cuerpo lúteo (Moore *et al.*, 1991).

Un estudio realizado en el rebaño de la estación experimental lechera en la Universidad de Tennessee exploró más a fondo la correlación entre la aparición de mastitis y la eficiencia reproductiva de vacas lecheras. Barker *et al.* (1998) clasificaron a vacas Jersey en lactación en grupos, vacas que no experimentaron mastitis, vacas que experimentaron mastitis antes de la primera inseminación artificial postparto, vacas con mastitis entre la primera inseminación artificial postparto y diagnóstico de gestación y vacas con mastitis después de la confirmación de la gestación. Las vacas fueron seguidas hasta 150 días en leche y la preñez se confirmó por recto palpación 50 a 65 días después de la inseminación artificial. El intervalo entre el parto y la primera inseminación artificial postparto, fue mayor para las vacas que tenían mastitis antes de la primera inseminación artificial en comparación con los otros grupos de vacas combinadas (93.6 ± 5.6 y 71.0 ± 2.2 días, respectivamente). El grupo de vacas que presentaron mastitis entre la primera inseminación artificial postparto y el diagnóstico de preñez, aumentaron los servicios por concepción (SPC, 2.9 ± 0.3 días) en comparación con las vacas que tenían mastitis antes de la primera inseminación artificial postparto (1.6 ± 0.3) y con las vacas que tenían mastitis después de la confirmación de la preñez o las que no tenían mastitis (1.7 ± 0.1 d). Además, las vacas que tenían mastitis antes de primera inseminación artificial postparto tuvieron un menor intervalo desde el parto hasta la concepción (113.7 ± 10.8 días) en comparación con el grupo de vacas que presentaron mastitis entre primera inseminación artificial postparto y el diagnóstico de preñez (136.6 ± 13.3 días). El grupo de vacas que experimentaron mastitis después de la confirmación de

la preñez o las vacas que no presentaron mastitis tuvieron el menor intervalo desde el parto hasta la concepción (92.1 ± 4.6 d). Curiosamente, la correlación de la mastitis y la fertilidad fue independiente del tipo de bacteria que causa la mastitis (gram-positiva o gram-negativa).

El mismo grupo de la Universidad de Tennessee realizó un estudio posterior en el cual se evaluó la correlación entre la mastitis subclínica y clínica con la fertilidad. En este estudio, las vacas Jersey se agruparon en: vacas que no presentaron mastitis, vacas con mastitis subclínica (bacterias aisladas de muestras de leche, sin alteraciones en la leche o en la glándula mamaria), vacas con mastitis clínica (Schrick *et al.*, 2001). Las vacas a su vez se dividieron según tipo de mastitis (gram-positivo o gram-negativo) y el momento del evento de la mastitis (antes de la primera inseminación post parto, entre la primera inseminación post parto y el diagnóstico de gestación y después de la confirmación de la gestación). Las vacas que no experimentaron mastitis, se agruparon con las vacas que experimentaron mastitis después de la confirmación de la gestación. De manera similar a los hallazgos de Barker *et al.*, (1998), vacas con mastitis clínica o mastitis subclínica antes de la primera inseminación post parto tuvieron un intervalo prologando entre parto y primera inseminación post parto (75.7 ± 1.8 días) en comparación con las vacas que no fueron infectadas o las vacas que tuvieron mastitis después de la confirmación de la gestación ($67,8 \pm 2,2$ días). Las vacas que tuvieron mastitis entre la primera inseminación post parto y el diagnóstico de gestación tuvieron un nivel intermedio entre el parto y la primera inseminación (75.2 ± 4.4 días). Además, los servicios por concepción fueron mayores para las vacas que experimentaron mastitis entre la primera inseminación post parto y el diagnóstico de gestación ($3,1 \pm 0,3$ días), seguido de aquellas vacas que experimentaron mastitis antes de la primera inseminación post parto (2.0 ± 0.1 días), en aquellas vacas que no tenían mastitis o tenían mastitis después de la confirmación de la gestación tuvieron menores servicios por concepción (1.6 ± 0.2 días). De manera similar al estudio de Barker *et al.*, (1998), la correlación entre la mastitis y la eficiencia reproductiva no fue dependiente del tipo de bacteria aislada de las muestras de leche.

En un estudio realizado en el valle central de California (Santos *et al.*, 2004), con 1.001 vacas lecheras Holstein de dos hatos lecheros, se clasificaron a las vacas de acuerdo con el momento de ocurrencia del primer caso de mastitis durante la lactancia ; vacas sin mastitis clínica (CON), mastitis que ocurre antes de primera inseminación post parto

(MG1), la mastitis que ocurre entre la primera inseminación post parto y el diagnóstico de gestación (MG2), o mastitis que ocurre después de la confirmación de la gestación (MG3). Las vacas fueron seguidas durante los primeros 320 días en leche, las tasas de concepción después la primera inseminación post parto y la proporción de vacas preñadas después de 320 días en leche fueron significativamente menores para MG1 y las vacas MG2 en comparación con las vacas CON y MG3 . Las vacas en el grupo MG2 tenían el mayor servicio por concepción en comparación con los otros tres grupos (CON = 2.59 ± 0.10 , MG1 = 2.62 ± 0.14 , MG2 = 3.05 ± 0.20 , MG3 = 2.47 ± 0.17). Además, las vacas que experimentaron mastitis, independientemente del momento del evento, tuvo una mayor incidencia de aborto entre 42 ± 7 y 180 ± 14 d después de inseminación artificial. Las vacas en los grupos MG1 y MG2 tuvieron un intervalo extendido desde el parto a la concepción en comparación con las vacas CON y MG3 (CON = 139.7 ± 3.7 , MG1 = 165.0 ± 5.7 , MG2 = 189.4 ± 6.4 y MG3 = 118.4 ± 6.4 d). Cuando las vacas se agruparon en: vacas que no experimentaron mastitis (CON) o experimentaron mastitis (MG1, MG2 y MG3), los grupos que experimentaron mastitis tuvieron un intervalo más prolongado desde el parto hasta la concepción .De manera similar a la estudios de Barker *et al.*, (1998) y Schrick *et al.*, (2001), el tipo de bacteria responsable del evento de mastitis no afectó la correlación entre la mastitis y el rendimiento reproductivo. Santos *et al.*, (2004b) demostraron que los animales que desarrollan mastitis antes de la inseminación artificial, desde la inseminación artificial hasta el diagnóstico de preñez y después del diagnóstico de preñez tuvieron una mayor incidencia de aborto que las vacas que no desarrollaron mastitis durante la lactancia.

Risco *et al.*, (1999) evaluaron el riesgo de pérdida fetal en 2087 vacas con diagnóstico de preñez. Los autores observaron durante el periodo de estudio 127 abortos y 60 casos de mastitis clínica. Después de evaluar el riesgo de aborto, llegaron a la conclusión de que las vacas con un diagnóstico de mastitis clínica durante los primeros 45 días de gestación tuvieron un riesgo 2,7 (95 % intervalo de confianza = 1,3 a 5,6) veces mayor de aborto dentro de los próximos 90 días de gestación que animales sin mastitis en el mismo rodeo. Santos *et al.*, (2004b) demostraron que los animales que desarrollan mastitis antes de la inseminación artificial, desde la inseminación artificial hasta el diagnóstico de preñez y después del diagnóstico de preñez tuvieron una mayor incidencia de aborto que las vacas que no desarrollaron mastitis durante la lactancia.

Chebel *et al.*, (2004) evaluaron los factores que afectan las tasas de concepción y la pérdida de gestación en vacas Holstein lactantes de tres hatos lecheros diferentes en el valle central de California. En este estudio se utilizó un total de 7,633 inseminaciones para la evaluación de los factores que afectan la tasa de concepción y 1,465 vacas diagnosticadas preñadas por ultrasonografía a los 31 días después de la inseminación artificial y se reexaminaron 14 días más tarde. Entre los factores evaluados se encontraban la ocurrencia de mastitis entre inseminación artificial y la confirmación de la gestación aproximadamente a los 45 días después de la inseminación artificial. Las vacas con mastitis experimentaron durante este intervalo tasas de concepción similares (24.0%) en comparación con aquellas vacas que no experimentaron mastitis (25.5%). Las vacas con mastitis clínica tuvieron 2,80 (intervalo de confianza de 95 %:1,16; 6,78) más posibilidades de perder preñeces entre los días 31 y 45 días que aquellas que no tuvieron mastitis. En un estudio posterior, el mismo grupo evaluó la correlación entre la mastitis subclínica y mantenimiento de la gestación (Moore *et al.*, 2005), las vacas fueron clasificadas como; vacas que presentaron mastitis subclínicas cuando tenían el recuento lineal de células somáticas mayor a 4.5 (LSCC > 4.5) en el día de la prueba inmediatamente antes de la inseminación, pero no tenían signos clínicos de mastitis (Moore *et al.*, 2005). La gestación fue diagnosticado a los 28 días después de inseminación artificial por ecografía y a los 35 días después de la inseminación artificial por palpación rectal, las vacas que experimentaban mastitis subclínica inmediatamente anterior a la inseminación tuvieron 2.40 veces más posibilidades de perder la gestación entre 28 y 35 días después de inseminación en comparación con aquellas vacas que tenían un recuento lineal de células somáticas menor a 4.5 (LSCC <4.5).

En otro estudio, McDougall *et al.*, (2005) evaluaron el rendimiento reproductivo de 2.004 vacas lactantes de 10 hatos lecheros alimentados con pasturas en Nueva Zelanda, vacas que recibieron la primera inseminación dentro de los 16 días posteriores al inicio de la temporada de servicio, se determinó la gestación 29-45 días después de inseminación artificial y a las 6, 8, 10, 14 y 22 semanas de gestación. Las vacas fueron seguidas durante toda la lactancia. En este estudio, el riesgo de pérdida de gestación fue 1,57 veces mayor para las vacas con mastitis en cualquier momento durante la lactancia en comparación con las que nunca experimentaron mastitis, a partir de los datos presentados anteriormente, está claro que existe una correlación entre la mastitis y la fertilidad, estos hallazgos han llevado a la hipótesis de que las respuestas inflamatorias e inmunes afectan el rendimiento

reproductivo , afectando las tasas de fertilización y la viabilidad de los embriones, comprometiendo el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de la gestación, es decir, reduciendo la supervivencia del embrión / feto ocasionando mayor incidencia de muertes embrionarias y fetales. Sin embargo, es importante tener en cuenta que no es posible descartar la posibilidad de que las vacas que son propensas a desarrollar mastitis sean más debilitadas y, en consecuencia, más propensas a desarrollar trastornos reproductivos que pueden, en última instancia afectar su fertilidad.

HIPÓTESIS

H0: No hay asociación entre la mastitis subclínica grado 2 y 3 con la pérdida de gestación temprana durante los primeros 90 días en vacas lecheras Holstein.

Ha: Hay asociación entre la mastitis subclínica grado 2 y 3 con la pérdida de gestación temprana durante los primeros 90 días en vacas lecheras Holstein.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre mastitis subclínica grado 2 y 3 con la pérdida temprana de gestación durante los primeros 90 días en un hato lechero Holstein.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la asociación entre los diferentes grados de mastitis subclínica con la pérdida temprana de gestación durante los primeros 90 días en un hato lechero Holstein.

Determinar la tasa de pérdida de gestación durante los primeros 90 días postinseminación en vacas lecheras Holstein.

Determinar el periodo de mayor pérdida de gestación una vez realizado el diagnóstico de gestación por medio de ultrasonografía transrectal.

Determinar el momento que presentaron el caso de mastitis subclínica y su relación con la pérdida de gestación durante los primeros 90 días en un hato lechero Holstein.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación Geográfica

Los experimentos se realizaron en las instalaciones de la hacienda Sausalito S.C.C de propiedad de la familia Montufar. La hacienda Sausalito S.C.C, es una unidad de producción pecuaria de carácter privado que se dedica a la producción de leche bajo un sistema de producción semi-intensivo. Se encuentra ubicada en Ecuador en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Tambillo. Geográficamente se localiza en la latitud sur: 00° 26' 382'' y en la altitud occidental: 078° 33' 801''. La hacienda se encuentra a 2827 m.s.n.m y en el sector existe una pluviosidad media de 1157.5 mm.

Descripción de la Hacienda

Tiene una extensión de 140 hectáreas distribuidas de la siguiente manera: 105 hectáreas para pastoreo de vacas de producción, 30 hectáreas para pastoreo de ganado seco, 5 hectáreas destinadas para infraestructura y potreros de terneras.

La alimentación de los animales se basa en el consumo de forraje verde constituido por: 70% kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y 30% Rye Grass (*Lolium perenne*), el consumo diario de la mezcla forrajera es aproximadamente de 12 kilos MS /vaca. Reciben además un concentrado de fabricación propia en base de soya, melaza y maíz. Este se entrega a razón de 5.5 kilogramos MS/ vaca / día en promedio, dividido dos veces (en cada ordeño). La alimentación complementaria se basa en ración mixta y se utiliza los siguientes componentes nutricionales: maíz molido, silo de maíz, torta de soya, melaza y sales minerales.

Unidades de Muestreo

La explotación cuenta con un promedio de 500 vacas en ordeño, con una producción media de 24 litros vaca/día. Para el estudio se analizaron los datos de 619 vacas. El periodo de estudio fue realizado durante los meses de octubre del año 2015 hasta diciembre del 2016.

Criterios de inclusión

Se consideraron bovinos hembras en lactación que recibieron alta médica posterior al parto, bovinos que pasaron el período de espera voluntario de 60 días y que estaban en condiciones de ser inseminadas.

Criterios de exclusión

Bovinos en lactación con evidencia clínica de enfermedades graves como problemas pódales, neumonía y problemas metabólicos. Las vacas que presentaron mastitis clínica mediante el despunte no fueron consideradas en este estudio debido a que reciben un tratamiento de antiinflamatorios y antibióticos para controlar la infección de la ubre.

Tipo de muestreo

La metodología de investigación aplicada a este trabajo se basó en un estudio de tipo observacional, analítico, de casos y controles.

Factores de estudio

Prueba de CMT

La prueba de California Mastitis Test (CMT) se realizó mensualmente a todo el hato lechero por un médico veterinario y se realizó el siguiente procedimiento.

Despunte: se descartaron los primeros chorros de leche en un recipiente de fondo oscuro con la finalidad de eliminar conteos altos de bacterias y células somáticas que se encuentran en el canal del pezón, se ordeñan dos chorros de leche de cada cuarto en cada

una de las placas de la paleta de CMT, se inclina la paleta para desechar el exceso de leche e igualar volumétricamente cada compartimento, se añade a la leche un volumen igual de reactivo, se mezcla homogéneamente y se examina en la presencia de una reacción de gelificación. Antes de continuar con la vaca siguiente se enjuaga la paleta. Se registró el resultado de cada vaca en la planilla de datos.

La interpretación y registro de resultados se realiza bajo el siguiente criterio.

Tabla 2.1. Interpretación del grado de CMT.

Negativo: 0	El estado de la solución permanece inalterado. La mezcla sigue en estado líquido. El 25% de las células son leucocitos polimorfonucleares.
Trazas:	Se forma un precipitado en el piso de la paleta que desaparece pronto. Hasta un 30% son leucocitos polimorfonucleares.
1 (+):	Hay mayor precipitado pero no se forma gel. De un 30 a 40% son leucocitos polimorfonucleares.
2 (++):	El precipitado se torna denso y se concentra en el centro. De un 40 a 70% son leucocitos polimorfonucleares.
3 (+++):	Se forma un gel muy denso que se adhiere a la paleta. De un 70 al 80% son leucocitos polimorfonucleares.

Fuente: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. 2000.



Negativo



Trazas



Uno (+)



Dos (++)



Tres (+++)



Clínica

Figura 2.1 Grados de mastitis subclínica y mastitis clínica.

DIAGNÓSTICO DE PÉRDIDAS DE GESTACIÓN

Ultrasonografía

El diagnóstico de gestación fue realizado por ultrasonografía transrectal (Mindray DP-10 VET con transductor de 8.5 mHZ) entre los 28 y 35 días post inseminación. El seguimiento de la gestación se lo realizó en dos ocasiones alrededor de los 60 y 90 días de gestación utilizando ultrasonografía transrectal.



Figura 2.2 Ecógrafo Mindray DP -10 VET.

La conformación de los grupos se realizó de la siguiente manera:

GRUPO CONTROL

Vacas diagnosticadas como preñadas a los 30 días postinseminación y que no tengan mastitis mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT: 0) hasta los 90 días postinseminación.

GRUPO 1

Vacas diagnosticadas como preñadas a los 30 días postinseminación y que presenten mastitis subclínica grado trazas y mastitis subclínica grado 1 mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT: T y 1) hasta los 90 días postinseminación.

GRUPO 2

Vacas diagnosticadas como preñadas a los 30 días postinseminación y que presenten mastitis subclínica grado 2 y mastitis subclínica grado 3 mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT: 2 y 3) hasta los 90 días postinseminación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la asociación entre la variable pérdida embrionaria y fetal en vacas lecheras Holstein durante los primeros 90 días de gestación con el factor de exposición presencia de mastitis subclínica se realizó la prueba Odds Ratio (OR) en el grupo 1 (CMT grado T y 1) y en el grupo 2 (CMT grado 2 y mastitis subclínica 3) , su nivel de significancia se analizó mediante la prueba de Ji cuadrada .

RESULTADOS

Vacas que son diagnosticadas como preñadas a los 30 días postinseminación y que no tengan mastitis mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT: 0) hasta los 90 días postinseminación son consideradas grupo control.

Grupo 1

Los resultados de la asociación entre mastitis subclínica grado trazas y grado 1 con la pérdida de gestación durante los primeros 90 días postinseminación en vacas lecheras se muestran en la Tabla 3.1. El Odds Ratio para este grupo fue de 0.94. Al realizar la prueba de Chi cuadrado se concluyó que no hubo asociación significativa entre la presencia de mastitis subclínica grado trazas y grado 1 con la pérdida de gestación.

Tabla 3.1 Resultados de Odds Ratio (OR) y pvalor del grupo 1 (vacas con mastitis subclínica grado T y 1).

Grado de Mastitis	Vacas con pérdida de gestación	Vacas mantiene la gestación	Total	OR	pvalor
T-1 Mastitis SC	28	179	207	0,94	>0,01
0 Sin Mastitis	44	265	309		
Total	72	444	516		

GRUPO 2

Los resultados de la asociación entre mastitis subclínica grado 2 y mastitis subclínica grado 3 con la pérdida de gestación durante los primeros 90 días postinseminación en vacas lecheras se muestran en la Tabla 3.2. El Odds Ratio para este grupo fue de 2,6. Al realizar la prueba de Chi cuadrado se concluyó que hubo asociación altamente significativa entre la presencia de mastitis subclínica grado 2 y grado 3 con la pérdida de gestación ($P < 0,01$).

Tabla 3.2 Resultados de Odds Ratio (OR) y pvalor del grupo 2 (vacas con mastitis subclínica grado 2 y 3).

Grado de Mastitis	Vacas con pérdida de gestación	Vacas mantiene la gestación	Total	OR	pvalor
2 -3 Mastitis SC	31	72	103	2.6	< 0,01
0 Sin Mastitis	44	265	309		
Total	75	337	412		

***Altamente significativo

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados de la puntuación de los distintos grados de mastitis subclínica con los resultados de la prueba de Odds Ratio (OR) y chi cuadrado, en la cual se concluye que las vacas con mastitis grado 2 tienen un riesgo de 2,24 veces más de tener una pérdida de gestación en comparación con vacas que no presentan mastitis durante los primeros 90 días postinseminación, mientras que las vacas con mastitis grado 3 tienen un riesgo de 2,93 veces más de tener una pérdida de gestación en comparación con vacas que no presentan mastitis durante los primeros 90 días postinseminación.

Tabla 3.3 Tabla 3.3. Resultados de Odds Ratio (OR) y pvalor de los distintos grados de mastitis subclínica.

Grado de Mastitis	N	Vacas con pérdida de gestación	Vacas mantiene la gestación	OR	pvalor
0	309	44	265	referencia	
T	130	14	116	0,72	> 0,01
1	77	14	63	1.38	> 0,01
2	48	13	35	2,24	< 0,05
3	55	18	37	2,93	< 0,01

*** Altamente Significativo

TASA DE PÉRDIDA DE GESTACIÓN

En la tabla 3.4 se muestran los resultados del número de vacas que perdieron la gestación y que presentaron mastitis subclínica durante los primeros 90 días postinseminación. Se puede observar que de un total de 103 vacas que perdieron la gestación, 31 vacas tuvieron cierto grado de infección en la ubre lo que posiblemente ocasiono la muerte embrionaria y fetal.

El mayor porcentaje de pérdida de gestación se presentó en vacas con mastitis subclínica grado 3.

Tabla 3.4. Porcentaje de vacas con pérdida de gestación según los grados de mastitis en vacas lecheras Holstein durante los primeros 90 días post inseminación.

Grado de Mastitis	N	Vacas con pérdida de gestación
0	309	44 (14%)
T	130	14 (11%)
1	77	14 (18 %)
2	48	13 (27%)
3	55	18 (33%)
Total	619	103 (17 %)

La mayor cantidad de muertes embrionarias y fetales ocurrió entre el día 30 a 60 postinseminación con un porcentaje del 12 %, mientras que entre los días 61 a 90 se registró el 5% de muerte fetal. Durante los primeros 90 días postinseminación se registró una pérdida embrionaria y fetal total del 17% según se muestra en la figura 3.1.

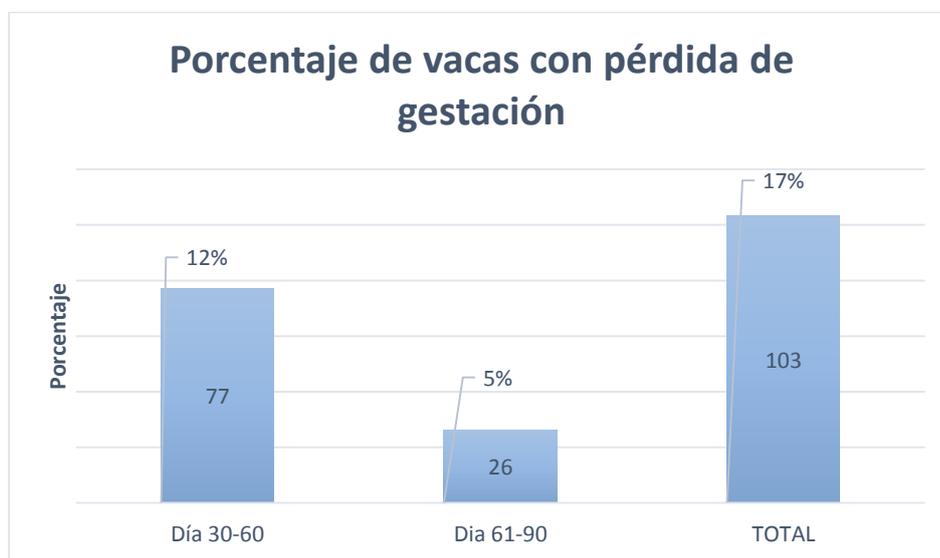


Figura 3.1 Porcentaje de pérdidas embrionarias y fetales entre los días 30-60 y 61-90 postinseminación en vacas lecheras Holstein.

Tabla 3.5 Número de vacas que pierden la gestación entre los días 30-60 y 61-90 postinseminación con distintos grados de mastitis subclínica (trazas, grado 1, grado 2, grado 3), y ausencia de mastitis en vacas lecheras Holstein.

Grado de Mastitis	Día 30-60	Porcentaje	Día 61-90	Porcentaje
0	34/309	11%	10/275	4%
t	11/130	9%	3/119	3%
1	11/77	14%	3/66	5%
2	9/48	19%	4/39	10%
3	12/55	22%	6/43	14%

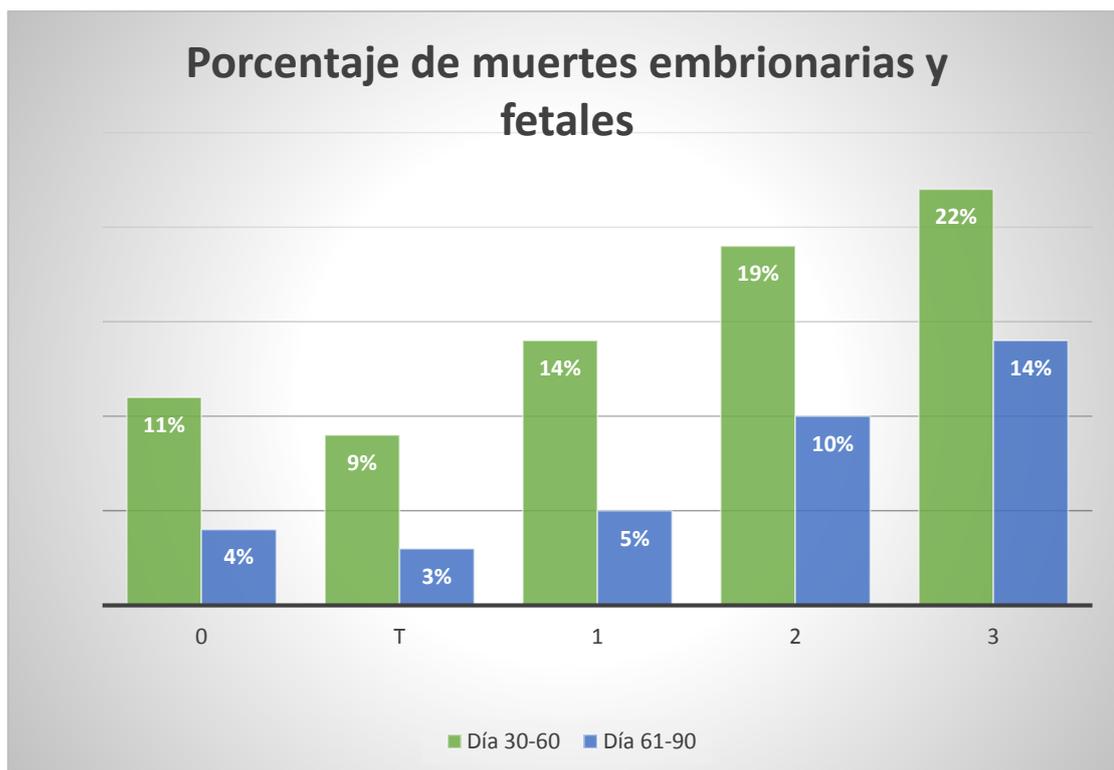


Figura 3.2 Número de pérdidas embrionarias y fetales entre los días 30-60 y 61-90 postinseminación de vacas que presentaron mastitis subclínica (trazas, grado1, grado2, grado3) y ausencia de mastitis en la prueba en leche de CMT.

En la tabla 3.6 se puede observar el momento que se determinó la mastitis subclínica y su relación con la mortalidad embrionaria y fetal. De las vacas que tuvieron mastitis subclínica grado 2 entre los 30 y 60 días postinseminación, el 89 % perdió la gestación, mientras que de las vacas que tuvieron mastitis subclínica grado 2 entre los 61 y 90 días de gestación, el 50 % perdió la gestación en ese periodo. Las vacas que tuvieron mastitis subclínica grado 3 entre los 30 y 60 días postinseminación el 67 % perdió la preñez, mientras que las vacas que tuvieron mastitis subclínica grado 3 entre los 61 a 90 días postinseminación el 17 % de vacas perdió la gestación en este periodo.

Tabla 3.6 Número de vacas que pierden la gestación entre los días 30-60 y 61-90 días con la presencia mastitis subclínica (trazas, grado 1, grado 2, grado 3), en vacas lecheras Holstein.

Grado Mastitis	Ocurrencia Mastitis	Pérdida gestación 30-60	Pérdida gestación 61-90	N total de Pérdidas
Grado T	Día 30 -60	2 (18%)	1(33%)	3
	Día 61-90	5 (45 %)	1(33%)	6
	Día 30-60-90	4 (36 %)	1(33%)	5
N Pérdidas		11	3	14
Grado 1	Día 30 -60	3 (27%)	1 (33%)	4
	Día 61-90	6 (55%)	2(67%)	8
	Día 30-60-90	2 (18%)	0	2
N Pérdidas		11	3	14
Grado 2	Día 30 -60	8 (89 %)	0	8
	Día 61-90	1 (11%)	2 (50 %)	3
	Día 30-60-90	0	2 (50 %)	2
N Pérdidas		9	4	13
Grado 3	Día 30 -60	8 (67 %)	4 (67%)	12
	Día 61-90	3 (25 %)	1 (17 %)	4
	Día 30-60-90	1 (8%)	1 (17%)	2
N Pérdidas		12	6	18

DISCUSIÓN

La producción de leche en el Ecuador está dividida en tres regiones, la región Sierra aporta el 77,21%, seguida de la Costa con el 17,96% y el Oriente representa el 4,82%. En relación al promedio de litros de leche producidos por vaca, la región que más se destaca es la Sierra con 7,20 litros/vaca/día, debido a la gran cantidad de ganado lechero existente y al cultivo de pastos (cultivados y naturales) que sirven para su alimentación. La región Oriental ocupa el segundo lugar con 4,70 litros/vaca y por último la región Costa con 3,52 litros/vaca (ESPAC 2016). Esto demuestra que la actividad lechera es el principal rubro económico para los pequeños y medianos productores del país.

La prevalencia de mastitis subclínica registrada en las ganaderías ecuatorianas es alta. En un estudio que se realizó en la zona occidental de la provincia del Azuay para determinar la prevalencia de mastitis subclínica (MSC) en vacas lecheras, se analizaron 9.652 cuartos mamarios de 2.413 vacas pertenecientes a 425 ganaderías, se concluyó en este trabajo que la prevalencia de mastitis subclínica por vaca fue de 42,1% y la prevalencia por hato del 74,6% (Coronel *et al.*, 2017).

La mastitis representa graves pérdidas económicas en los rodeos lecheros de todo el mundo (DeGraves *et al.*, 1993). Se estima que, de las pérdidas producidas por mastitis, el 29 % representa costos directos y 71% indirectos, entre estos últimos el aumento de los días en leche, especialmente en vacas que sufren la enfermedad al inicio de la lactancia (Miller *et al.*, 1993). Las pérdidas económicas debido a la mastitis se han asociado con una reducción en la producción y calidad de la leche, aumentos en el recuento de células somáticas, costos en tratamientos, leche descartada y mayor riesgo de descarte (Santos *et al.*, 2004). En un estudio realizado por Lorenti *et al.*, (2017), demostraron una clara asociación entre los recuentos de células somáticas elevados y una falla en eficiencia reproductiva (aumento en el intervalo parto primera inseminación, disminución en la probabilidad de concepción al primer servicio y en la preñez final).

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman la hipótesis planteada; existe asociación entre la mastitis subclínica grado 2 y 3 con la pérdida de gestación temprana durante los primeros 90 días en vacas lecheras Holstein.

En el grupo 2 (vacas mastitis subclínica grado 2 y 3) hubo asociación con la pérdida de gestación durante los primeros 90 días postinseminación en vacas lecheras, el Odds Ratio para este grupo fue de 2,6. La pérdida de gestación evidenciada en este grupo podría ser causada por la regresión lútea prematura inducida por la liberación de citoquinas como la prostaglandina $F2\alpha$, $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$ y/o el efecto de endotoxinas, como el LPS (lipopolisacárido) y exotoxinas bacterianas, sobre el ovario, el útero y/o el embrión (Hansen *et al.*, 2004; Hertl *et al.*, 2014). Se ha reportado que vacas con mastitis tienen mayores concentraciones en sangre de 13,14 dihidro-15-ceto $PGF2\alpha$ (el mayor metabolito de $PGF2\alpha$) seguidos de cambios en las concentraciones de oxitocina (Giri *et al.*, 1984; Hocket *et al.*, 2000) y otras citoquinas como ON (óxido nítrico), $TNF \alpha$ que afectan la maduración y desarrollo del oocito y más tarde la del embrión pudiendo ocasionar inclusive una luteólisis temprana. Por otro lado, ha sido muy estudiado el impacto que tiene la hipertermia sobre la fertilidad. Una elevación de la temperatura corporal durante la maduración del oocito o el desarrollo embrionario temprano conlleva a una reducción en la sobrevivencia del embrión (Putney *et al.*, 1988; Ealy *et al.*, 1993). El efecto de la temperatura es directo sobre la maduración del oocito y la fase preimplantacional del embrión (Edwards y Hansen, 1997). Igualmente, se ha observado una disminución de la formación de blastocitos en fertilización *in vitro* de oocitos colectados bajo efectos de alta temperatura corporal (Dutt, 1963). Un grupo de investigadores mencionó que el efecto de la mastitis sobre la reproducción se acentuaba cuando las vacas pasaban de mastitis subclínica a clínica (Hansen *et al.*, 2004).

Los resultados de la asociación de vacas del grupo 2 con la pérdida de gestación durante los primeros 90 días postinseminación coinciden con el trabajo de Moore (2005) en cual se evaluó la correlación entre mastitis subclínica y el mantenimiento de la gestación. Las vacas que experimentaban mastitis subclínica inmediatamente ($LSCC > 4.5$) antes de la IA tenían 2.40 veces más probabilidades de perder la gestación entre 28 y 35 días después de la IA en comparación con las vacas que tenían un recuento lineal células somáticas menor a 4.5 ($LSCC < 4.5$) (Moore *et al.*, 2005).

En este estudio la pérdida general de la gestación entre los 30 a 60 días fue del 12 % y entre los 61 a 90 días fue del 5 %. Las pérdidas reproductivas en vacas lecheras en lactancia han aumentado en los últimos años y estas pérdidas parecen ser multifactoriales (Santos *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2013). Las disminuciones en la tasa de concepción parecen estar asociadas con mayor producción de leche e incidencia de trastornos de salud al inicio del postparto (Ribeiro *et al.*, 2013).

Resulta claro que las vacas lecheras de alta producción presentan importantes pérdidas de preñez desde la fertilización hasta el parto de un ternero vivo. En la mayoría de los establecimientos, los productores y los veterinarios sólo reconocen las pérdidas fetales que ocurren después del día 40 ó 50 de la gestación. En la mayoría de los casos, no pueden determinarse los agentes causales. Sin embargo, la mayoría de las pérdidas de preñez ocurren durante las etapas embrionarias del desarrollo. La mortalidad embrionaria es considerada la principal causa responsable por el aumento en el intervalo entre partos en los bovinos (Thatcher *et al.*, 1994; Vanroose *et al.*, 2000; Sreenan *et al.*, 2001).

Estos resultados coinciden con el estudio que realizó McDougall *et al.*, (2005), en el cual se evidenció la preponderancia y los factores de riesgo relacionados con las pérdidas de preñez en vacas lecheras en lactancia alimentadas a pastura en Nueva Zelanda. Un total de 2004 vacas preñadas participaron en el estudio y 128 animales (6,4 %) perdieron la preñez. La tasa de pérdida de preñez fue mayor entre las semanas 6 a 10 de gestación que entre las semanas 10 a 14. De igual forma Santos *et al.*, (2004) resumieron información de varios experimentos y observaron que el riesgo de pérdida de preñez era mucho mayor al comienzo de la gestación que hacia el final. Entre los días de gestación 30 y 45, se perdieron aproximadamente el 12,8 % de las preñeces. Sin embargo, después del día 45, cuando el intervalo entre los diagnósticos de preñez fue más prolongado que 15 días, se perdieron menos del 11 %. En la mayoría de los tambos en los Estados Unidos, alrededor del 10 al 15 % de las preñeces se pierden entre los 40 días de gestación y la parición. Por lo tanto, las pérdidas embrionarias tempranas tienen mayor preponderancia que las tardías que, a su vez, tienen mayor preponderancia que las pérdidas fetales (Santos *et al.*, 2004). La mayoría de las

muertes embrionarias ocurre durante el periodo embrionario de la gestación (< 45 días) tanto en bovinos de carne como de leche (Thatcher *et al.*, 1994; Vanroose *et al.*, 2000; Sreenan *et al.*, 2001).

Mediante la ultrasonografía y otros métodos para el diagnóstico precoz de la preñez, varios investigadores han logrado caracterizar el momento y el alcance de las pérdidas embrionarias tardías en el ganado. Humblot (2001) evaluó las pérdidas embrionarias en vacas Holstein en 44 rebaños en Francia y observó que la muerte embrionaria temprana y tardía después de la primera IA fue 31,6 y 14,7%, respectivamente. La muerte embrionaria tardía después del día 27 de gestación varió del 3,2% en vacas lecheras que producen 6000-8000 kg de leche por año en Irlanda (Silke *et al.*, 2002) hasta al 42,7% en vacas de alta producción bajo estrés por calor (Cartmill *et al.*, 2001).

Debe mencionarse que en las vacas que presentaron mastitis subclínica grado dos y grado tres no se realizaron cultivos bacterianos en leche, por lo tanto no se determinó si la pérdida de la gestación estuvo relacionada por bacterias gram positivas, bacterias gram negativas o una combinación de ambas, sin embargo, el objetivo del estudio fue determinar la asociación y no factores causales. La mastitis causada por bacterias gram-negativas puede causar bacteriemia en más del 30% de los casos en las vacas afectadas (Wenz *et al.*, 2001). La pared celular de las bacterias Gram-positivas está compuesta de muchas capas del mucopeptido peptidoglicano (Salyers *et al.*, 1994). Las bacterias gram-positivas no tienen endotoxina, pero la presencia de estas bacterias en el tejido provoca una respuesta inflamatoria que es idéntica a la provocada por las endotoxinas de las bacterias gram-negativas (Salyers *et al.*, 1994). Las bacterias gram -positivas en el torrente sanguíneo también pueden causar los mismos tipos de síntomas de shock séptico que las bacterias gram-negativas (Salyers *et al.*, 1994). Las mismas citoquinas provocadas por lipolisacáridos (LPS) se liberan, y los mismos efectos fisiológicos se observan (Salyers *et al.*, 1994). Es posible que fragmentos de peptidoglicano, ácidos teicoicos o una combinación de los dos jueguen el mismo rol que LPS (Salyers *et al.*, 1994). En conejos, la inyección de peptidoglicano resultó en una respuesta pirética comparable a la provocada por la endotoxina (Rotta *et al.*, 1975).

Las vacas que presentaron mastitis subclínica grado 2 entre los días 30 y 60 postinseminación, el 89 % perdieron la gestación, mientras que en el mismo grupo de vacas que presentaron mastitis subclínica grado 2 entre los 61 y 90 días postinseminación, el 50 % de las vacas perdieron la gestación. Las vacas que presentaron mastitis subclínica grado 3 entre los días 30 y 60 postinseminación, el 67 % de las vacas perdieron la gestación, mientras que las vacas que presentaron mastitis subclínica grado 3 entre los 61 y 90 días postinseminación, el 17% de las vacas perdieron la gestación. Estos datos nos sugieren que un gran porcentaje de vacas pierden la gestación en la etapa embrionaria tardía cuando ocurre un proceso infeccioso en la ubre alrededor de los días 30 y 60 días postinseminación. Chebel *et al.*, 2004 observaron que las vacas en producción que experimentaron mastitis clínica en los primeros 45 días después de la IA fueron 2.8 veces más propensas a experimentar muerte embrionaria tardía entre los 31 y 45 días de gestación. Schrick *et al.* (2001) indicaron que no solo las vacas con mastitis clínica, sino también la mastitis subclínica se asocia con un mayor riesgo de pérdida de preñez en el ganado.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Los resultados de los experimentos confirman la asociación entre mastitis subclínica grado 2 y grado 3 con la pérdida temprana de gestación durante los primeros 90 días en vacas lecheras Holstein en lactancia.

Se determinó que vacas que tienen mastitis subclínica grado 2 y 3 tienen respectivamente 2,24 y 2,93 más chances de tener pérdida de gestación durante los primeros 90 días postinseminación.

La pérdida de gestación general entre los 30 a 60 días fue del 12 % y entre los 61 a 90 días fue del 5 %.

La pérdida de gestaciones hasta el día 90, fue del 14% en el grupo control (sin mastitis) mientras que fue de 27% y 33% en las hembras que desarrollaron mastitis del grado 2 y 3 respectivamente.

Dentro del grupo de vacas que perdieron la gestación asociado a mastitis subclínica grado 2 entre los 30 a 60 días, el 89 % de vacas perdió la gestación en este periodo, mientras que las vacas que tuvieron mastitis subclínica grado 2 entre los 61 y 90 días el 50 % de vacas perdieron la gestación.

Dentro del grupo de vacas que perdieron la gestación asociado a mastitis subclínica grado 3 entre los 30 a 60 días, el 67 % de vacas perdió la gestación en este periodo, mientras que las vacas que tuvieron mastitis subclínica grado 3 entre los 61 y 90 días el 17 % de vacas perdieron la gestación.

CAPITULO 6

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, N., Schrick, F.N., Butcher, R.L., Inskeep, E.K., 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52, 1129–1135.
- Alpizar E, Spicer LJ., 1994. Effects of interleukin-6 on proliferation and follicle-stimulating hormone-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: dependence on size of follicle. *Biol Reprod* 50:38–43.
- Antoniazzi, A. Q., Webb, B. T., Romero, J. J., Ashley, R. L., Smirnova, N. P., Henkes, L. E., & Hansen, T. R. 2013. Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in ewes. *Biology of reproduction*, 88(6), 144.
- Austin, E.J., M. Mihm, M.P. Ryan, D.H. Williams, and J.F. Roche. 1999. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J. Anim. Sci.* 77:2219-2226.
- Ayalon, N., 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54, 483–493.
- Barker Ar., Schrick, F.N., Lewis MJ, Dowlwn HH, Oliver SP. 1998. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of jersey cows. *J DairySci* 81: 1285-1290.
- Bedolla CC. 2004a. Mastitis Bovina. Cuatro Vientos. No 41. Febrero-Marzo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 24-26.
- Bedolla CC. 2004b. Métodos de detección de la mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Mimeo. 8 pp.
- Bertolini M., S.W. Beam, H. Shim, L.R. Bertolini, A.L. Moyer, T.R. Famula, and G.B. Anderson. 2002. Growth, development, and gene expression by in vivo- and in vitro-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Mol. Rep. Dev.* 63:318-328.
- Blowey R, y Edmonson P. 1995. Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. *Acribia*. Zaragoza. 208 pp.
- Blum JW, Dosogne H, Hoeben D, Vangroenweghe F, Hammon HM, Bruckmaier RM, Burvenich C. 2000. Tumor necrosis factor- α and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Dom Anim Endocrinol*;19:223–235.
- BonDurant RH. 2007. Selected diseases and conditions associated with bovine conceptus loss in the first trimester. *Theriogenology*;68:461-473.

- Bott RC, Ashley RL, Henkes LE, Antoniazzi AQ, Bruemmer JE, Niswender GD, Bazer FW, Spencer TE, Smirnova NP, Anthony R. 2010. Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biol Reprod.*;82:725–735. doi: 10.1095/biolreprod.109.079467
- Bouchard, L., S. Blais, C. Desrosiers, X. Zhao, and P. Lacasse. 1999. Nitric oxide production during endotoxin-induced mastitis in the cow. *J. Dairy Sci.* 82: 2574.
- Buford, W.I., N. Ahmad, F.N. Schrick, R.L. Butcher, P.E. Lewis, and E.K. Inskeep. 1996. Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progesterone. *Biol. Reprod.* 54: 351.
- Cartmill, J.A., El-Zarkouny, S.Z., Hensley, B.A., Lamb, G.C., Stevenson, J.S., 2001a. Stage of cycle, incidence and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J. Dairy Sci.* 84, 1051–1059.
- Cerón, M., Agudelo, E., Maldonado, J. (2007). Relación entre el recuento de células somáticas individual o tanque de leche y prueba de CMT en dos fincas lecheras del departamento de Antioquia. pp. 472-483. Recuperado el 18 de Julio de 2012, de: http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902007000400006&lng=es&nrm=
- Cerri, R.L.A., Bruno, R., Chebel, R.C., Galvão, K.N., Rutigliano, H., Thatcher, W.W., Luchini, D., Santos, J.E.P 2003. Effect of source of fatty acids on fertilization rate and embryo quality in early postpartum high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87 (Suppl. 1), in press (abstract).
- Chebel RC, Santos JEP, Reynolds JP, Cerri RLA, Juchem SO, Overton M. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*; 84:239-255.
- Chen, H.W., W.S. Jiang, and C.R. Tzeng. 2001. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil. Steril.* 75: 1163.
- Coronel D., Espinosa M, 2017. Prevalencia de mastitis subclínica en ganado bovino lechero de la zona occidental de la provincia del Azuay. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador, 70 pp.
- Davidson, J.A., U. Tiemann, J.G. Betts, and P.J. Hansen. 1995. DNA synthesis and prostaglandin secretion by bovine endometrial cells as regulated by interleukin-1. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 1037.
- DeGraves, F.J., Fetrow, F., 1993. Economics of mastitis and mastitis control. *The Veterinary Clinics of North America: Update on Bovine Mastitis*, vol. 9, pp. 421–434.
- De la Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. 1993. Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci*;76:1002-1013.

- Dorniak, P., Bazer, F. W., & Spencer, T. E. 2013. Physiology and endocrinology symposium: biological role of interferon tau in endometrial function and conceptus elongation. *Journal of animal science*, 91(4), 1627-1638.
- Drost M, Ambrose JD, Thatcher, MJ, Lantrell CK, Wolfsdorf KE, Hasler JF, Thatcher WW. 1999. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology*, 52:1161-1167.
- Dutt R.H. 1963. Critical period for early embryo mortality in ewes exposed to high ambient temperature. *J Anim Sci*; 22:713-719
- DVG, Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft. 2000. Leitlinien zur Bekämpfung der Mastitis als Bestandsproblem. 5.Ausfl. Verlag DVG e.V., Gießen.
- Ealy A.D., Drost M y Hansen P.J. 1993. Developmental changes in embryonic to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J Dairy Sci*; 78:2899-2905
- Edwards, J.L., and P.J. Hansen. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 138.
- Erskine RJ. 2001. Mastitis Control in Dairy Herds. In: Radostits OM, editor. *Herd Health Food Animal Production Medicine*. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. pp 397-433.
- Fairchild, D.L., and J.L. Pate. 1991. Modulation of bovine luteal cell synthetic capacity by interferon-d. *Biol. Reprod.* 44: 357.
- Ferrano, L., Scaramelli, A. y Troya, H.(1999). Prevalencia de la Mastitis Subclinica Bovina en Venezuela y Evaluación de la Prueba de Mastitis de California (CMT) como prueba diagnóstica. *Revista Científica, FCV- Luz. Volumen IX. N°2. Maracay, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.* 84 Recuperado el 1 de Julio de 2012, de: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27145/2/articulo1.pdf>
- Forar AL, Gay JM, Hancock DD, Gay CC. 1996. Fetal loss frequency in ten Holstein dairy herds. *Theriogenology*; 45:1505-1513.
- Galvão, K.N., L.F. Greco, J.M. Vilela, and J.E.P. Santos. 2006a. Effect of intrauterine infusion of cettiofur on uterine health. *J. Dairy Sci.* 89 (Suppl.1):9(Abstr.).
- Galvão, K.N., Santos, J.E.P., Juchem, S.O., Cerri, R.L.A 2002. Effect of addition of a CIDR insert to the Heatsynch protocol on ovulation rate, pregnancy rate, and pregnancy loss in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87 (Suppl.1), in press (abstract).
- Gifford, C.A., Racicot, K., Clark, D.S., Austin, K.J., Hansen, T.R., Lucy, M.C., Davies, C.J., Ott, T.L. 2007. Regulation of interferonstimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 274–280.

- Gilbert, R.O., S.T. Shin, C.L. Guard, H.N. Erb, and M. Frajblat M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 64:1879-1888.
- Giri SN, Chen Z, Carroll EJ, Mueller R, Schiedt MJ, Panico L. 1984. Role of prostaglandins in pathogenesis of bovine mastitis induced by *Escherichia coli* endotoxin. *Am J Vet Res* 45: 586-591.
- Giri SN, Stabenfeldt GH, Moseley TA, Graham TW, Bruss ML, Ceron-Muñoz, M., Tonhatl, H., Duarte, J., Oliveira, J., Muñoz-Berrocal, M., Jurado-Gámez, H. 2002. Factors Affecting Somatic Cell Counts and Their Relations with Milk and Milk Constituent Yield in Buffaloes. *J. Dairy Sci.* 85:2885-2889.
- Green JC, Okamura CS, Poock SE, Lucy MC. 2010. Measurement of interferon-tau (IFN- τ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* ;121(1- 2):24–33.
- Green, J. C., Volkmann, D. H., Poock, S. E., McGrath, M. F., Ehrhardt, M., Moseley, A. E., & Lucy, M. C. 2005. Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef cattle. *Journal of dairy science*, 92(8), 3819-3824.
- Gröhn, Y.T., Rajala-Schultz, P.J., 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 605–614.
- Guilbault LA, Dufour JJ, Thatcher WW, Drost M, Haibel GK. 1986. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil* ;78:127-135.
- Gümen, A., Guenther, J.N., Wiltbank, M.C., 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 3184–3194.
- Han H, Austin KJ, Rempel LA, Hansen TR (2006). Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *J Endocrinol* 191: 505–512.
- Hansen P.J., Paolete S. y Natzke R.P. 2004. Mastitis and fertility in cattle – Possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *A.J.R.I.* 54: 294.
- Hertl J. A., Schukken Y. H., Welcome F. L., Tauer L. W., y Gröhn Y. T. J. 2014. Effects of pathogen-specific clinical mastitis on probability of conception in Holstein dairy cows. *Dairy Sci.* 97:6942–6954.
- Hobbs, A.J., A. Higgs, and S. Moncada. 1999. Inhibition of nitric oxide synthase as potential therapeutic target. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 191.

- Hockett, M.E., F.M. Hopkins, M.J. Lewis, A.M. Saxton, H.H. Dowlen, S.P. Oliver, and F.N. Schrick. 2000. Endocrine profiles of dairy cows following experimentally induced clinical mastitis during early lactation. *Anim. Reprod. Sci.* 58:241.
- Hoeben, D., C. Burvenich, E. Trevisi, G. Berton, J. Hamann, R.M. Bruckmaier, and J.W. Blum. 2000. Role of endotoxin and TNF- α in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J. Dairy Res.* 67: 503.
- Hillerton, J.& Berry, E., 2005. Treating mastitis in the cow a tradition or an archaism, institute for Animal Health, Compton. *XCVIII* (9):1250 -1255.
- Humblot, P., 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology* 56, 1417–1433.
- Inskip, E.K., 2002. Factors that affect embryo survival in the cow: application of technology to improve calf crop. In: Fields, M.J., Sand, R.S., Yelich, J.V. (Eds.), *Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 255–279.
- Instituto Nacional Ecuatoriano de Censos. Encuesta de superficie y producción agropecuaria continúa ESPAC. Quito-Ecuador (2016) pp 17.
- Kindahl H, Edqvist LE, Granstrom E, Bane A. 1976. Release of prostaglandin-F $_{2\alpha}$ as reflected by 15-keto-13,14- dihydroprostaglandin F $_{2\alpha}$ in peripheral-circulation during normal luteolysis in heifers. *Prostaglandins*; 11: 871 878.
- Krinninger, III, C.E., Block, J., et al. (2002) Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* ,58, 171-182.
- Li, P.S., and W.C. Wagner. 1983. In vivo and in vitro studies on the effect of adrenocorticotrophic hormone or cortisol on the pituitary response to gonadotropin releasing hormone. *Biol. Reprod.* 29: 25.
- López-Gatiús, F., Santolaria, P., Yániz, J., Rutllant, J., López-Béjar, M., 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Anim. Reprod. Sci.* 57, 1251–1261.
- Lorenti, S., De la Sota. RL 2017. Efecto del conteo de células somáticas sobre diferentes parámetros de eficiencia reproductiva en vacas lecheras a base pastoril. Tesis Especialidad. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, Pag 11-17.
- Lucy, M.C., 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84, 1277–1293.
- Maltz, E., S. Devir, J.H.M. Metz, H. Hogeveen. 1997. The body weight of the dairy cow. I.

- Introductory study into body weight changes in dairy cows as a management aid. *Livest. Prod.Sci.* 48: 175.
- McCann, S.M., M. Kimura, S. Karanth, W.H. Yu, C.A. Mastronardi, and V. Rettori. 2000. The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 917: 4.
- McCracken J.A., Custer E.E., Lamsa J.C. 1999. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiological Reviews.* (79) 263- 323
- McDougall, S., F. M. Rhodes, and G.A. Verkerk. 2005. Pregnancy loss in dairy cattle in the Waikato region of New Zealand. *N. Zeal. Vet. J.* 53:279-287.
- Medina CM, y Montaldo VH. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México. 29-31 de Mayo.
- Mellenberger, R., Roth, C. (2000). Dpto. de Ciencia Animal, Universidad del Estado de Michigan y Universidad de Wisconsin - Mádison. Recuperado el 15 de Noviembre de 2012, de: <http://www.uwex.edu/milkquality/PDF/CMT%20spanish.pdf>.
- Mihm, M., Curran, N., Hyttel, P., Boland, M.P., Roche, J.F., 1999. Effect of dominant follicle persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 116, 293–304.
- Miller G., Paul C., Lance E., Anderson J., Lawrence E. 1993. Cost of clinical mastitis and mastitis prevention in dairy herds. *Journal American Veterinary Medical Association.* 202: 75 – 83.
- Moore, D.A., Cullor, J.S., Bondurant, R.H., Sischo, W.M., 1991. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy cattle. *Theriogenology* 36, 257–265.
- Moore, D.A., M.W. Overton, R.C. Chebel, M.L. Truscott, and R.H. BonDurant. 2005. Evaluation of factors that affect embryonic loss in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226:1112.
- Morresey PR. 1999. Bovine Mastitis. In: Howard JL, Smith RA, editors. *Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice.* Philadelphia, Penn: WB Saunders Co, 563-568.
- Nandi, S., M. Kumar, M. Manohar and R.S. Chauhan. 2009. Bovine herpes virus infections in cattle. *Anim Health Res Rev* 10:85-98.
- Oliveira JF, Henkes LE, Ashley RL, Purcell SH, Smirnova NP, Veeramachaneni DN, Anthony RV, Hansen TR. 2008. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN-tau release from the uterine vein. *Endocrinology.*;149:1252–1259.

- Padmanabhan, V., C. Keech, and E.M. Convey. 1983. Cortisol inhibits and adrenocorticotropin has no effect on luteinizing hormone-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone from bovine pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 112: 1782.
- Pampfer, S., Y.D. Wu, I. Vanderheyden, and R. De Hertogh. 1994. Expression of tumor necrosis factor- β (TNF- β) receptors and selective effect of TNF β on the inner cell mass in mouse blastocyst. *Endocrinology* 134: 206.
- Petroff, M.G., B.K. Petroff, and J.L. Pate. 2001. Mechanisms of cytokine-induced death of cultured bovine luteal cells. *Reproduction* 121:753.
- Philpot WN. 2001. Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Junio de 2001. León, Gto. México. 26 pp.
- Philpot, W. y Nickerson, S. (1992). *Mastitis: El contra ataque*. Publicado por Surge Internacional. Naperville, IL. U.S.A. Babson Brothers Co.USA. pp 1-7, 29, 53.
- Philpot, W. y Nickerson, S. (2002). *Vencendo a Luta Contra a Mastite*. Publicado por Westfalia Surge Inc. e Westfalia Landtechnik do Brasil Ltda. Brasil. Milkbizz. Edição Brasileira. pp 6-9, 15-17, 22-27, 38-43.
- Pritchard JY, Schrick FN, Inskeep EK. 1994. Relationship of pregnancy rate to peripheral concentration of progesterone and estradiol in beef cows. *Theriogenology* ;42:247-259.
- Putney D.J., Drost M y Thatcher W.W. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenolgy*. 30 :195-209
- Radostis, O. (1992). *Medicina Veterinaria tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. Madrid, España. Traducción del inglés por Isabel Álvarez et al. 9º Edición. Editorial Interamericana. Vol. 1. pp 711-746.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2000. *Veterinary Medicine A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*. 9th ed. London, GB: WB Saunders Co.
- Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. 2002. *Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina*. Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. pp 728, 810.
- Revah, I., Butler,W.R., 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 106, 39–47.
- Rhodes, F.M., McDougall, S., Burke, C.R., Verkerk, G.A., Macmillan, K.L., 2003. Invited review: treatment of cows with extended postpartum anestrous interval. *J. Dairy Sci.* 86, 1876–1894.

- Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro AP, Favoreto M, Ayres H, Marsola RS, Martinez N, Thatcher WW, Santos JEP. 2013. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J Dairy Sci*, 96:5682 -5697.
- Risco, C.A., Donovan, G.A., and Hernandez, J. 1999. Clinical Mastitis Associated with Abortion in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* Vol82 N°8 1684-1689.
- Riollet, C., P. Rainard, B. Poutrel. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cowmilk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 84: 1077.
- Roberts, R. M., Ealy, A. D., Alexenko, A. P., Han, C. S., & Ezashi, T. 1999. Trophoblast interferons. *Placenta*, 20(4), 259-264.
- Robinson R. S., Mann G. E., Lamming G. E., Wathes D. C.. 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*122:965–979.
- Rotta, J. 1975. Endotoxin-like properties of the peptidoglycan. *Z. Immunitaetsforsch.* 149:230–244.
- Ruiz, S. (1996). Presencia de mastitis subclínica en ocho hatos de la periferia de Uruapán, Michoacán, en bovinos productores de leche. Michoacán, México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. pp 35-38.
- Rutigliano and J.E.P Santos.2005. Interrelationships among parity, body condition score (BCS) , milk yield, AI protocol,and cyclicity with embryonic survival in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89(Suppl. 1): 39(Abstr.).
- Salyers, A. A., and D. D. Whitt. 1994. Pages 56 and 341 *in* Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. ASM Press, Washington D.C.
- Sangsrivong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *J Dairy Sci* ;85:2831-2842.
- Santos, J.E.P., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L.A., Galvão, K.N., 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 513–535.
- Santos, J.E.P., Cerri, R.L.A., Ballou, M.A., Higginbotham, G.E., Kirk, J.H., 2004a. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*80, 31–45.

- Santos, J.E.P., Villasenor, M., DePeters, E.J., Robinson, P.H., Holmberg, C.H., 2003. Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows: plasma gossypol, health, and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 86, 892–905.
- Santos, J.E.P., Bartolome, J.A., Cerri, R.L.A., Juchem, S.O., Thatcher, W.W., Hernandez, O., Trigg, T., 2004b. Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. *Theriogenology* 61, 421–435.
- Santos, J.E.P., Bisinotto RS, Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Staples CR, Thatcher WW. 2010 Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 67:387- 403.
- Saran A, y Chaffer M. 2000. Mastitis y calidad de leche. Inter-Médica. Buenos Aires. 194 pp. Smith BP. 1990. Large Animal Internal Medicine. St Louis, Missouri: The C. V. Mosby Co.
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., Wiltbank, M.C., 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85, 2803–2812.
- Sartori, R., Gumen, A., Guenther, J.N., Souza, A.H., Caraviello, D.Z., Wiltbank, M.C., 2006. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 65, 1311–1321.
- Schrack, F. N., M. E. Hockett, A. M. Saxton, M. J. Lewis, H. H. Dowlen, and S. P. Oliver. 2001. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.* 84:1407–1412.
- Shaham-Albalancy, A., Y. Folman, M. Kaim, M. Rosenberg, and D. Wolfenson. 2001. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF 2α secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction*. 122:643-648.
- Silke, V., Diskin, M.G., Kenny, D.A., Boland, M.P., Dillon, P., Mee, J.F., Sreenan, J.M., 2002. Extent, pattern and factors associated with late embryonic losses in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 71, 1–12.
- Silvia WJ, Lewis GS, McCracken JA, Thatcher WW, Wilson L., Jr. 1991. Hormonal regulation of uterine secretion of prostaglandin F 2 alpha during luteolysis in ruminants. *Biol Reprod*; 45: 655 663.
- Skarzynski, D.J., Y. Miyamoto, and K. Okuda. 2000. Production of prostaglandin F $2b$ by cultured bovine endometrial cells in response to tumor necrosis factor b: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Biol. Reprod.* 62: 1116.
- Smith BP. 1990. Large Animal Internal Medicine. St Louis, Missouri: The C. V. Mosby Co.

- Soto, P., R.P. Natzke, and P.J. Hansen. 2003. Identification of possible mediators of embryonic mortality cause by mastitis: actions of lipopolysaccharide, prostaglandin F_{2α}, and the nitric oxide generator, sodium nitroprusside dihydrate, on oocyte maturation and embryonic development in cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50: 263.
- Spencer TE & Bazer FW. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience* 7 d1879–d1898.
- Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. 2001. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of highfertility. In: *Fertility in the high producing dairy cow.* 26 *Occ Publ Br Soc Anim Sci*; 93-104.
- Stevenson JL1, Dalton JC, Ott TL, Racicot KE, Chebel RC. 2007. Correlation between reproductive status and steady-state messenger ribonucleic acid levels of the Myxovirus resistance gene, MX2, in peripheral blood leukocytes of dairy heifers. *J Anim Sci.* 2007 Sep;85(9):2163-72.
- Stoebel, D.P., and G.P. Moberg. 1982. Effect of adrenocorticotropin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows. *J. Dairy Sci.* 65: 1016.
- Thatcher, W.W., A. Guzeloglu, R. Mattos, M. Binelli, T.R. Hansen, and J.K. Pru. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56:1435-1450.
- Thatcher WW, Meyer MD & Danet-Desnoyers G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement* 49 15–28.
- Thatcher WW, Guzeloglu A, Meikle A, Kamimura S, Bilby T, Kowalski AA, Badinga L, Pershing R, Bartolome J, Santos JEP. 2003. Regulation of embryo survival in cattle. *Reproduction, Suppl* 61:253-266.
- Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt E-P. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J Anim Sci*; 72 (Suppl. 3): 16-30.
- Thurmond MC, Picanso JP, Jameson CM. 1990. Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal losses in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*,197:1305-1312.
- Vanroose G, de Kruif A, Van Soom A. 2000. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim Reprod Sci*; 60: 131-143.
- Vasconcelos JLM, Silcox RW, Lacerda JA, Pursley JR, Wiltbank MC. 1997. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to head stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biol Reprod*; 56: 140 (Abstract).
- Waller, K.P., I.G. Colditz, K. Östensson. 2003. Cytokines in mammary lymph and milk during endotoxin-induced bovine mastitis. *Res. Vet. Sci.* 74: 31.

- Webb, R., P.C. Garnsworthy, J.G. Gong, and D.G. Armstrong. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* 82(E-Suppl):E63-E74.
- Wenz, J.R., G.M. Barrington, F.B. Garry, K.D. McSweeney, R.P. Dinsmore, G. Goodell, and R.J. Callan. 2001. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219: 976.
- Wolfenson D, Thatcher WW, Badinga L, Savio JD, Meidan R, Lew BJ, Braw-Tal R, Berman A. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.* 52:1106-1113.
- Wolter W, Castañeda H, Kloppert B, y Zschöck M. 2004. Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. 146 pp.
- Wooding, F. B. P., Roberts, R. M., & Green, J. A. 2005. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: possible functional implications. *Placenta*, 26(10), 807-827.
- Wuu, Y.D., S. Pampfer, P. Becquet, I. Vanderheyden, K.H. Lee, and R. De Hertogh. 1999. Tumor necrosis factor b decreases the viability of mouse blastocyst in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.* 60: 479.
- Yankey SJ, Hicks BA, Carnahan KG, Assiri AM, Sinor SJ, Kodali K, Stellflug JN, Stellflug JN & Ott TL. 2001. Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes. *Journal of Endocrinology* 170 R7–R11.
- Zeron, Y., Ocheretny, A., Kedar, O., Borochoy, A., Sklan, D., Arav, A., 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 121, 447–454.
- Zoli, A. P., Guilbault, L. A., Delahaut, P., Ortiz, W. B., & Beckers, J. F. 1999. Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. *Biology of Reproduction*, 46(1), 83-92.
- Zurita, L. (1982). Mastitis bovina con especial énfasis en la realidad nacional. Facultad de Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales Universidad de Chile. Recuperado el 1 de Diciembre de 2012, de: <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/Article/4855/4740>