

- P.A., Roehle M.P. and Rijsewijk F.A., 2009. High prevalence of co-infections with bovine herpesvirus 1 y 5 found in cattle in Southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, 139-1, 67-73.
- Ellis J.A., 2009. Update on viral pathogenesis in BRD. *Animal health research reviews, Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 10-2, 149-153.
 - Jones C., Chowdhury S., 2007. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Animal Health Research Reviews, Conference of Research Workers in Animal Diseases*, 8-2, 187-205.
 - Muylkens B., Meurens F., Schynts F., Farnir F., Pourchet A., Bardiau M., Gogev S., Thiry J., Cuisenaire A., Vanderplasschen A., 2006. Intraspecific bovine herpesvirus 1 recombinants carrying glycoprotein E deletion as a vaccine marker are virulent in cattle. *The Journal of General Virology*, 87-8, 2149-2154.
 - Odeón A.C., Spath E.J.A., Paloma E.J., Leunda M.R., Fernandez Sainz I.J., Perez S.E., Kaiser G.G., Draghi M.G., Cetrá B.M., Cano A., 2001. Seroprevalencia de la diarrea viral bovina, herpesvirus bovino y virus sincicial respiratorio en Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*, 82, 216–220.
 - van Oirschot J.T., Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A., 1996. Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Veterinary Microbiology*, 53-1, 43-54.
 - Parreño V., Romera S.A., Makek L., Rodriguez D., Malacari D., Maidana S., Compaired D., Combessies G., Vena M.M., Garaicoechea L., 2010. Validation of an indirect ELISA to detect antibodies against BoHV-1 in bovine and guinea-pig serum samples using ISO/IEC 17025 standards. *Journal of Virological Methods*, 169-1, 143-153.
 - Romera S.A., Hilgers L.A., Puntel M., Zamorano P.I., Alcon V.L., Dus Santos M.J., Blanco Viera J., Borca M.V., Sadir A.M., 2000. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine*, 19-1, 132-141.

Premio Biogénesis Bagó, versión 2013

Primera Mención del Premio Biogénesis Bagó 2013

Endometritis subclínica en vacas de tambo

Subclinical endometritis in dairy cows

Madoz LV^{1,2,6}, Jaureguiberry M¹, Domínguez AG³, Migliorisi AL^{1,4},

Albarracín D^{3,5}, Giuliadori MJ⁶, De la Sota RL^{1,2}

1 Cátedra de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP), 2 CONICET, 3 Práctica privada, 4 Cátedra de Patología General, FCV-UNLP, 5 Cátedra de Patología Especial, FCV-UNLP, 6 Cátedra de Fisiología animal, FCV-UNLP,

Palabras clave: Citología endometrial, eficiencia reproductiva, neutrófilos, ciclo estral.

RESUMEN

Los objetivos de este estudio fueron: 1) adaptar y mejorar el dispositivo originalmente utilizado para el diagnóstico de endometritis subclínica (ES), 2) Evaluar el efecto del ciclo estral sobre el porcentaje de neutrófilos (PMN), 3) determinar la prevalencia de ES (21-62 dpp) y 4) Evaluar el impacto de la ES sobre la eficiencia reproductiva en vacas de tambo bajo condiciones pastoriles.

El trabajo se realizó en tambos comerciales de la provincia de Buenos Aires. En el primer experimento se seleccionaron 17 vacas Holstein sincronizadas. Se obtuvieron muestras de citología endometrial y de sangre los días 0, 4, 11 y 18 del ciclo estral. Se evaluaron los % PMN y la concentración sérica de P4. Los datos fueron analizados con PROC MIXED, PROC GENMOD y PROC FREQ de SAS 9.1. El % PMN no varió con la etapa del ciclo estral, además dicho % fue siempre inferior a cualquier punto de corte para el diagnóstico de ES. En el segundo experimento, se utilizaron 418 vacas Holstein (21-62 dpp) sin endometritis clínica. Las muestras de citología endometrial fueron obtenidas por la técnica de cepillado endometrial. Los datos fueron analizados con curvas ROC y con PROC GLIMMIX, PROC PHREG, y PROC LIFETEST de SAS 9.1. Los valores de corte determinados para el diagnóstico de ES fueron 8% PMN entre 21-33 dpp, 6% PMN entre 34-47 dpp, 4% PMN entre 48-62 dpp y del 5% PMN para todo el intervalo 21-62 dpp; la prevalencia de ES encontrada fue de 17% (21-62 dpp). Las vacas con ES tuvieron menor tasa de concepción al primer servicio (16,2%) y tuvieron 29 días más de días abiertos comparados con vacas sin ES.

ABSTRACT

The objectives of this study were: 1) Adapt and improve a tool for subclinical endometritis (SE) diagnosis, 2) Assess the effect of estrous cycle stage on the endometrial polymorphonuclear cells (PMN) percentage to determine cutoff values for SE diagnosis under pastoral conditions, 3) Measure the prevalence of SE (21 to 62 days in milk (DIM)), and 4) Evaluate SE effect on reproductive performance in grazing dairy cows. The study took place on commercial dairy farms located in Buenos Aires province. For the first experiment 17 Holstein cows were selected and synchronized. Endometrial cytology and blood samples were obtained on d 0, 4, 11, and 18 of the estrous cycle. Percentage of PMN and P4 concentration were evaluated. Data were analyzed with PROC MIXED, PROC GENMOD, and PROC FREQ from SAS 9.1. The percentage of PMN did not vary with the stage of the estrous cycle. In addition, PMN counts were below any of the reported thresholds for most of the cows. On the second experiment 418 lactating Holstein dairy cows between 21 to 62 DIM without clinical endometritis were studied. Samples of endometrial cytology were collected with the cytobrush technique. Data were analyzed with ROC curves, and with PROC GLIMMIX, PROC PHREG, and PROC LIFETEST from SAS 9.1. Cutoff values for the diagnosis of SE in grazing dairy cows are 8% PMN for 21 to 33 DIM, 6% PMN for 34 to 47 DIM, 4% PMN for 48 to 62 DIM, and overall 5% PMN for 21 to 62 DIM; the prevalence of SE 21 to 62 DIM was 17%. Finally, cows with SE showed lower conception rate to first service (16,2%) and had 29 days more of calving to conception interval.

INTRODUCCIÓN

La endometritis es la inflamación de la capa más interna del útero, se la clasifica en: clínica (EC) cuando se acompaña de descargas uterinas mucopurulentas o purulentas y subclínica (ES) cuando se presenta en vacas clínicamente sanas. Las vacas con ES tienen disminuida notablemente su eficiencia reproductiva en la siguiente gestación, aumentando los días abiertos (Kasimanickam et al., 2004; Madoz et al., 2013). Esto conlleva al aumento de los costos del tambo (honorarios,

inseminaciones, tratamientos, días sin producción de leche) que impactan en la economía. El diagnóstico de ES se basa en el conteo de neutrófilos (PMN) en muestras de citología endometrial, siendo positivo cuando el porcentaje encontrado de dichas células es mayor al punto de corte utilizado para el diagnóstico (Sheldon et al., 2006). La mejor forma de obtener las muestras se basa en un suave cepillado del endometrio (Kasimanickam et al., 2005). El dispositivo originalmente utilizado para obtener estas muestras presenta un inconveniente para su aplicación a campo debido a que requiere la esterilización de sus partes metálicas entre cada uso (Kasimanickam et al., 2004).

Por otro lado, para poder validar la técnica nos encontramos además con el interrogante de si los cambios fisiológicos cíclicos que ocurren en el endometrio (Ohtani et al., 1993) podían llegar a afectar el diagnóstico de ES. Los estudios existentes que determinaban la prevalencia de ES provenían de sistemas de producción estabulado y los puntos de corte variaban ampliamente (Barlund et al., 2008; Gilbert et al., 2005; Kasimanickam et al., 2004). Debido a esto, surgió la necesidad de conocer los puntos de corte que se adecuaban a nuestra realidad y validar la técnica diagnóstica a lo largo del ciclo, evitando así extrapolar resultados de trabajos llevados a cabo bajo sistemas intensivos.

OBJETIVOS

Nuestro primer objetivo fue el desarrollo y adaptación de un dispositivo que permita obtener muestras endometriales en vacas de una manera más rápida y económica para un diagnóstico certero de ES a campo. Posteriormente, el segundo objetivo fue validar la técnica, determinar el grado de variación del diagnóstico a lo largo del ciclo estral, determinar valores de corte aplicables para el diagnóstico de ES en tambos argentinos de explotación pastoril y basándonos en esto, determinar el real impacto de la enfermedad sobre la eficiencia reproductiva de los vientres. Todo esto con el fin de detectar las vacas problema y desarrollar un tratamiento y/o manejo efectivo para mejorar la eficiencia reproductiva de los tambos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos, ambos con hembras bovinas en postparto de raza Holstein pertenecientes a tambos comerciales de la provincia de Buenos Aires. Los animales no debían haber presentado distocia, aborto, retención de membranas fetales ni tratamientos intrauterinos en o posterior a su último parto. A continuación, se describe la metodología común a los dos experimentos.

Evaluación general

Previo a la toma de muestras, se realizó la medición de la condición corporal (escala de 0 a 5, criterio de inclusión ≥ 2.5), palpación transrectal y diagnóstico de endometritis clínica (EC) por la técnica de flujeo.

Diagnóstico de ES

Se utilizó un nuevo modelo de pistola de acero inoxidable, cuya superioridad técnica respecto de los dispositivos existentes, reside en que no requiere la esterilización de las piezas entre muestreos. Utiliza cepillos ginecológicos cérvico-uterinos Papanicolaou (Medibrush XL, Argentina) y vainas sanitarias de IA (IMV, Francia), ambos descartables. Cambiando el cepillo y la vaina, se puede muestrear varias vacas sin contaminación cruzada, minimizando el tiempo y los costos requeridos. La técnica consiste en: una vez enhebrado el cérvix mediante una maniobra similar a la de IA, dirigir la pistola a un cuerno, exponer el cepillo a la superficie endometrial, girar dos vueltas; luego retraerlo dentro de la vaina sanitaria. Inmediatamente desmontar el cepillo de la pistola, rotarlo sobre un portaobjetos y fijar para la preservación de la morfología celular. Una vez en el laboratorio, se colorearon las muestras con tinción comercial diferencial rápida (Tinción 15, Biopur, Argentina). La evaluación de las muestras se realizó con microscopio óptico a 400X, se contaron y diferenciaron 200 células por preparado para así obtener el porcentaje (%) de PMN sobre células totales.

Experimento 1. Estudio de los cambios de la citología endometrial a lo largo del ciclo estral bovino

Se utilizaron vacas en postparto y en buen estado de salud general (n=53) que se encontraban entre 27 y 56 días postparto (dpp) al momento del comienzo de la toma de muestras (día [d] 0). Se seleccionaron vacas cíclicas, sin EC (con flujo normal translúcido y sin rastros de pus) que fueron sincronizadas según el protocolo Ovsynch (Pursley et al., 1997). El día 0 fue tomado como el último día de la sincronización, 12 h luego de la segunda dosis de GnRH. Se tomaron muestras de citología endometrial y de sangre de todos los animales sincronizados (n=17) los días 0 (estro), 4 (metaestro), 11 (diestro) y 18 (proestro) del ciclo estral. La sangre se utilizó para la medición de las concentraciones séricas de Progesterona (P4) mediante un kit comercial de RIA en fase sólida (Coat-A-Count, USA). Se determinó el porcentaje de PMN y de células blancas mononucleares sobre las células totales. El conteo se realizó a ciegas por dos evaluadores y por triplicado. Además, se evaluó la citometría (área, perímetro y diámetro de Feret) de 10 células endometriales por preparado (ImageJ, USA). Se evaluaron los porcentajes de PMN y de células mononucleares (GENMOD, SAS), el tamaño de las células endometriales y las concentraciones de P4 sérica durante los diferentes días de muestreo por PROC MIXED (SAS, 2003). La concordancia entre los diagnósticos de ES obtenido por los diferentes operarios se evaluó mediante el índice Kappa.

Experimento 2. Determinación de los puntos de corte para el diagnóstico de endometritis subclínica por la técnica de cepillado endometrial con el dispositivo desarrollado y estudio de su prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva en vacas de tambo

Se utilizaron vacas (n=487) entre los 21 y 62 dpp. Las vacas con EC fueron descartadas del estudio, las muestras de citología endometrial fueron recolectadas mediante la técnica descrita y evaluadas como fue explicado anteriormente. El diagnóstico de gestación se realizó por palpación transrectal entre los días 35 y 65 post IA.

El punto de corte (porcentaje de PMN) fue obtenido mediante el análisis de la curva ROC. El riesgo de preñez de las vacas con y sin ES, fue estimado mediante una función de sobrevivencia de Kaplan-Meier con el procedimiento LIFETEST de SAS. La tasa de riesgo de preñez fue estimada por riesgos proporcionales de Cox con el procedimiento PHREG de SAS. Por último, las variables dicotómicas como el PP1IA, el PRE100, y el VAC200 fueron analizadas por regresión logística con el procedimiento

GENMOD de SAS 9.1. (SAS, 2003)

RESULTADOS

Experimento 1

Las concentraciones séricas de P4 halladas en las vacas sincronizadas, demostraron claramente la efectividad del protocolo utilizado (d0, $0,42 \pm 0,42$; d4, $1,16 \pm 0,43$; d11, $4,69 \pm 0,44$; d18, $2,85 \pm 0,46$ ng/ml; $P < 0,01$). Todas las vacas muestreadas resultaron negativas a ES ya que los porcentajes de PMN encontrados siempre estuvieron por debajo de los valores de corte determinados para el diagnóstico de ES ($< 4-8\%$, 21-62 dpp). De hecho, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de PMN entre los diferentes días del ciclo estral ($1,51 \pm 0,50$, $P > 0,64$). El porcentaje de mononucleares tampoco mostró diferencias significativas entre los distintos días del ciclo estral ($1,44 \pm 0,32$, $P > 0,06$).

Experimento 2

La curva ROC identificó como puntos de cortes a $\geq 8\%$ PMN para el INT21-33, $\geq 6\%$ PMN para el INT34-47, $\geq 4\%$ para el INT48-62 y 5% para el INT21-62. Usando los puntos de corte obtenidos de las curvas ROC, la prevalencia de ES calculada sobre vacas negativas a EC (n=385) fue de 21.5% , 16.0% , 16.0% y 17% para los INT21-33, INT34-47, INT48-62 y INT21-62 respectivamente.

Las vacas con ES tuvieron una disminución del $16,2\%$ de preñez a la primera IA y del $16,8\%$ de preñadas a los 100 dpp comparado con las vacas normales ($P < 0,02$, $P < 0,01$; respectivamente); y un aumento del 7% del porcentaje de vacas vacías a los 200 dpp ($P < 0,10$). Las vacas normales tendieron a preñarse más precozmente que las vacas con ES 21 a 62 dpp (MDV=94 vs 123,5 d, $P = 0,006$). Para vacas con ES comparadas con vacas sin ES, la razón de riesgo de preñez fue de 0.64 y la tasa de preñez relativa fue de 36% ($P < 0.01$).

CONCLUSIONES

En conclusión, el desarrollo del dispositivo mencionado permitió validar por primera vez en nuestro país la técnica de citología endometrial bovina para realizar el diagnóstico de ES; y determinar los puntos de corte del

porcentaje de PMN que se corresponden con una disminución de la eficiencia reproductiva. La prevalencia de ES encontrada en vacas de tambo bajo sistema de producción pastoril en Argentina fue del 17%. El porcentaje de PMN no varía a lo largo del ciclo estral en vacas normales sin EC y por lo tanto el diagnóstico de ES por la técnica que utilizamos, refleja los cambios inflamatorios que ocurren en el endometrio.

Por otro lado, con porcentajes de PMN superiores al 8%, 6%, 4% y 5% a los 21 a 33, 34 a 47, 48 a 62 y 21 a 62 dpp se comienza a observar una disminución de la eficiencia reproductiva. De hecho, las vacas con ES tuvieron un 16.2% de reducción en la tasa de concepción al primer servicio, un 16.8% de reducción en la cantidad de vacas preñadas a los 100 días de lactancia y 29 días más de días abiertos en comparación con las vacas sin ES. Esto representaría una pérdida económica de U\$S 44.3 a U\$S 82.6 por vaca/lactancia; que llevado al rodeo nacional en ordeño, representaría un costo de 11 a 20.5 millones de dólares anuales por aumento de los días de vaca vacía (intervalo parto-concepción).

BIBLIOGRAFÍA

- Barlund, C.S., Carruthers, T.D., Waldner, C.L., Palmer, C.W., 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69, 714-723.
- Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H.N., Frajblat, M., 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64, 1879-1888.
- Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S., Johnson, W.H., 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62, 9-23.
- Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S., Johnson, W.H., 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 46, 255-259.
- Ohtani, S., Okuda, K., Nishimura, K., Mohri, S., 1993. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 39, 1033-1042.
- Pursley, J.R., Wiltbank, M.C., Stevenson, J.S., Ottobre, J.S., Garverick, H.A., Anderson, L.L., 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows

and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. J Dairy Sci 80, 295-300.

- SAS, 2003. SAS and STAT Users Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology 65, 1516-1530.

Premio Biogénesis Bagó, versión 2013

Segunda Mención del Premio Biogénesis Bagó 2013

Consecuencias reproductivas de la hipocuprosis bovina: un avance hacia su diagnóstico y prevención en rodeos de Argentina

Rosa, DE¹.; Fazzio LE¹; Mattioli GA¹; Picco SJ.^{1,2}; Furnus CC. ^{1,2}

¹Laboratorio de Nutrición Mineral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118, La Plata 1900, Bs As, Argentina. ²CCT-CONICET. La Plata.

Palabras clave: cobre, reproducción, rodeos de cría.

Keywords: copper, reproduction, cow-calf operation

RESUMEN

La deficiencia de cobre o hipocuprosis bovina genera pérdidas productivas por fallas inmunológicas y/o reproductivas. Su diagnóstico se realiza por análisis de cupremia, cuando las deficiencias son severas (< 30 µg/dL) aparecen las menores ganancias de peso. Sin embargo, no se conoce qué valores de cupremia podrían afectar la reproducción, con qué consecuencias y a través de qué mecanismos. Con el objetivo general de poder predecir y comprender las fallas reproductivas por hipocuprosis, se generaron objetivos particulares que fueron: 1. evaluar la asociación entre cupremias y niveles de cobre en licor folicular; 2. evaluar los niveles indicativos de carencia en el licor folicular con técnicas de fertilidad in vitro, como maduración in vitro de ovocitos, fertilización in vitro y