

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



MUERTE EMBRIONARIA TARDÍA EN VACAS DE TAMBO

Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Autor: Med.Vet. Zoot. MSc. Quintero Rodríguez, Luis Ernesto

Director: Dr. Giuliadori, Mauricio Javier

Codirector: Dra. Madoz, Laura Vanina

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones en Reproducción Animal (INIRA), Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Miembros del Jurado

Dr. Moore, Prando Dadin

Dra. Tríbulo, Paula

Dr. Fazzio, Luis Emilio

La Plata, 15 de octubre de 2020

DEDICATORIA

A mis padres, que siempre me han apoyado a lo largo de mi vida en todos mis proyectos brindándome su amor, apoyo y confianza.

AGRADECIMIENTOS

Mis mayores agradecimientos van dirigidos para cuatro personas en particular: Mauricio, Vanina, Luzbel y Germán.

A mi director de tesis, Dr. Mauricio Giuliiodori, le agradezco por su calidez humana que hace sentir bien a cualquier persona que trabaja con él, por brindar su capacidad y experiencia sin reservas, por confiar en mí en todo momento, por siempre intentar que los avances sean con aprendizaje, además de ayudarme con la lectura constructiva de esta tesis. Durante estos años más que mi director y compañero de oficina lo considero un buen amigo.

A mi codirectora de tesis, Dra. Laura Vanina; por estar siempre cuando más la he necesitado, escuchándome y ayudándome en temas tanto académicos como de la vida, además infinitas gracias por la lectura constructiva de esta tesis y por sus asesorías con respecto a temas de laboratorio y muestreo a campo. Gracias por su amistad.

Al Dr. Luzbel de la Sota, por darme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y por haber confiado en mí desde el primer momento, y por estar siempre cuando lo he necesitado para solucionar temas tanto académicos como personales, además le agradezco por sus valiosos aportes en el diseño de esta tesis y sus experimentos a campo. Gracias por su amistad.

Para el MV Germán Domínguez, quien junto al MV Eduardo Ravera, fueron excelentes personas conmigo y me hicieron sentir uno más, gracias por sus enseñanzas en el campo y por su valiosa colaboración en la toma de las muestras,

de igual manera agradezco a los dueños y personal del establecimiento el broquel por haber prestado su buena voluntad para la realización de los muestreos, en especial agradezco a Pedro, Ramón y Luis, quienes me ayudaron con la toma de las muestras, y quienes con sus mates y charlas hicieron ameno el muestreo.

A mis compañeros de oficina, Ramiro Rearte, Esteban Galarza, Raulito, Joaquín y Nico Lorenti por hacer del ambiente de trabajo un sitio ameno y alegre, a lo largo de estos años más que ser mis compañeros se convirtieron en buenos amigos, gracias por estar siempre ahí escuchándome y compartiendo temas tanto académicos y de la vida.

De igual modo, quiero agradecer a todas las personas de la Cátedra y el Servicio de Reproducción Animal que siempre con su buena empatía y actitud me hicieron sentir cómodo en todo momento, además de haber compartido salidas a campo y muchas charlas con mate, en especial a Lorena Migliorisi, quien junto a María Jaureguyberry me han colaborado en temas administrativos y académicos.

A Quincho Soto, quien sin conocerme me alquilo su departamento al llegar al país, le doy las gracias por estar siempre que lo necesitaba. Gracias por su amistad.

A Laura Juárez por su gentileza y confianza en temas relacionados con mi estancia en el país.

A todo el personal del CEDIVE, en especial a Gabriel Traveria y Fiorella por ayudarme y enseñarme a procesar las muestras de esta tesis, además que con su calidez humana que los caracteriza me hicieron sentir muy cómodo en su laboratorio.

A todo el personal de LAINPA (Laboratorio de Inmunoparasitología) en especial a Gastón Moré y Lucía Campero, quienes me orientaron en el procesamiento de las muestras para Neospora y además de su calidez humana me hicieron sentir muy bien en su laboratorio.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP por haberme permitido realizar los estudios doctorales, en especial a las personas de la secretaria de posgrado (Romina y Pedro) quienes siempre me han colaborado en todos los temas administrativos concernientes al doctorado.

Al Foncyt, que gracias a la adjudicación de PICT otorgado al Dr Rodolfo Luzbel de la Sota me concedió una beca doctoral de iniciación.

Al CONICET por haberme becado para finalizar mis estudios de posgrado.

A los jurados por su acompañamiento en todo el proceso del doctorado, lo cual ha permitido enriquecer el trabajo.

A todos los profesores de los cursos y seminarios que realice por sus valiosos aportes a mi formación académica.

A todas las personas maravillosas que he conocido a lo largo de mi estancia en el país, en especial a Dudbil, Paola, Luis Peralta, Pedro Sosa, Julieta, Laura, Cesar que con su amistad hicieron que mis días fueran más amenos y alegres.

¡¡ A todos Muchas Gracias!!

PUBLICACIONES PARCIALES REALIZADAS DE LA TESIS

REVISTAS CON REFERATO

1. Quintero Rodríguez LE, Rearte R, Domínguez G, de la Sota RL, Madoz LV, Giuliadori MJ. Late embryonic losses in supplemented grazing lactating dairy cows: Risk factors and reproductive performance J. Dairy Sci 2019; 102:9481-9487.

2. Quintero Rodríguez LE, Rearte R, Domínguez G, Ravera E, de la Sota RL, Madoz LV, Giuliadori MJ. Muerte embrionaria tardía en vacas de tambo: factores de riesgo y eficiencia reproductiva. Taurus 2020; 87:14-20.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

1. Quintero Rodríguez LE, Rearte R, Domínguez G, de la Sota RL, Madoz LV, Giuliadori MJ. Risk factors for late embryo loss in grazing dairy cows. 30th World Buiatrics Congress. Sapporo, Japón, 28 de agosto a 1 de septiembre de 2018. Presentación de Poster N° 32.

2. Quintero Rodríguez LE, Campero LM, Moré G, Domínguez G, de la Sota RL, Venturini C, Madoz LV, Giuliadori MJ. Lack of association of neospora caninum infection with late embryo losses in grazing dairy cows. Anim. Reprod 2018;15(1):1068 (Abstract). 10 International Ruminant Reproduction Symposium (IRRS), Foz Do Iguazú, Brasil, 16 al 20 de septiembre 2018.

3. Quintero Rodriguez LE, Rearte R, Domínguez G, de la Sota RL, Madoz LV, Giuliadori MJ. Late embryonic losses in supplemented grazing lactating dairy cows: risk factors and reproductive performance. First Symposium of the European College of Animal Reproduction. Viena Austria. 4 al 6 de julio de 2019. Presentación de Poster N° 21.

4. Quintero Rodríguez LE, Rearte R, Domínguez G, de la Sota RL, Madoz LV, Giuliadori MJ. Muerte embrionaria tardía en vacas de tambo: Factores de riesgo y eficiencia reproductiva. XIII Simposio Internacional de Reproducción Animal (IRAC). 28 al 30 de agosto de 2019. Córdoba, Argentina. Presentación de Poster N° 98.

5. Quintero LE, Domínguez G, Alvarado MF, Traveria G, De la Sota RL, Madoz LV, Giuliadori MJ. Association between infectious diseases with late embryonic losses in supplemented grazing dairy cow. Resumen enviado World Buiatrics Congress 2020, Madrid, España. Enviado.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
PUBLICACIONES PARCIALES REALIZADAS DE LA TESIS.....	VI
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	XIII
LISTA DE TABLAS	XV
LISTA DE FIGURAS	XVI
TITULO: MUERTE EMBRIONARIA TARDÍA EN VACAS DE TAMBO..	XVII
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY	XIX
 CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	 21
1. INTRODUCCIÓN.....	21
1.1 Generalidades	21
1.2 Clasificación de las pérdidas de gestación	21
1.3 Caracterización diagnóstica de las pérdidas de gestación	22
1.4 Incidencia de MET	24
1.5 Causas de MET	25
1.5.1 Causas no infecciosas	25
1.5.1.1 Factores ambientales.....	25
1.5.1.2 Factores nutricionales	26
1.5.1.3 Factores productivos.....	27

1.5.1.4 Factores hormonales	27
1.5.1.5 Enfermedades uterinas y no uterinas	28
1.5.1.6 Otras causas	29
1.5.2 Causas infecciosas	29
1.5.2.1 Neospora caninum (<i>N. caninum</i>)	30
1.5.2.2 Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)	31
1.5.2.3 Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)	31
1.5.3 Salud uterina y eficiencia reproductiva post MET	32
 CAPÍTULO 2: MUERTE EMBRIONARIA TARDÍA: FACTORES DE RIESGO Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA.....	
	35
2. INTRODUCCIÓN.....	35
2.1 OBJETIVOS.....	36
2.2 HIPÓTESIS	37
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.3.1 Selección y manejo de los animales	37
2.3.2 Definición de las enfermedades.....	38
2.3.3 Diseño experimental	39
2.3.4 Análisis estadístico	40
2.4 RESULTADOS	42
2.4.1 Asociación de MET con la producción de leche y eficiencia reproductiva.	42
2.4.2 Factores de riesgo para MET	42
2.5 DISCUSIÓN.....	47
2.5.1 Incidencia de MET	47

2.5.2 Asociación de MET con la eficiencia reproductiva.....	48
2.5.3 Factores de riesgo para MET	48
2.6 CONCLUSIONES.....	51
CAPÍTULO 3: CAUSAS INFECCIOSAS DE MUERTE EMBRIONARIA	
TARDÍA EN VACAS DE TAMBO	52
3. INTRODUCCIÓN.....	52
3.1 OBJETIVOS.....	53
3.2 HIPÓTESIS	53
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.3.1 Selección y manejo de los animales	54
3.3.2 Diseño experimental	54
3.3.3 Muestreo	55
3.3.4 Análisis de laboratorio	56
3.3.4.1 Detección serológica de VDVB por Virus Neutralización (VN)	56
3.3.4.2 Detección serológica de VDVB por ELISA.....	57
3.3.4.3 Determinación del efecto citopático de VDVB	58
3.3.4.4 Detección de VDVB por RT-qPCR.....	59
3.3.4.5 Detección serológica de IBR por VN	60
3.3.4.6 Determinación del efecto citopático de IBR.....	60
3.3.4.7 Detección de IBR por LAMP	61
3.3.4.8 Detección serológica de <i>N. caninum</i> por Inmunofluorescencia Indirecta	62
3.3.4.9 Detección de <i>N. caninum</i> por PCR.....	63
3.3.4.10 Análisis de progesterona.....	64

3.3.5 Análisis estadístico	64	
3.4 RESULTADOS	65	
3.4.1 Riesgo de MET	65	
3.5 DISCUSIÓN.....	69	
3.6 CONCLUSIONES.....	73	
CAPÍTULO 4: SALUD UTERINA Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA POST		
MUERTE EMBRIONARIA TARDÍA.....		74
4. INTRODUCCIÓN.....	74	
4.1 OBJETIVOS.....	75	
4.2 HIPÓTESIS	75	
4.3 MATERIALES Y MÉTODOS	76	
4.3.1 ESTUDIO 1	76	
4.3.1.1 Diseño experimental	76	
4.3.1.2 Criterios de selección y muestreo	76	
4.3.1.3 Análisis estadístico	77	
4.4 RESULTADOS	77	
4.3.2 ESTUDIO 2	80	
4.3.2.1 Diseño experimental	80	
4.3.2.2 Criterios de selección y muestreo	80	
4.3.2.3 Diagnóstico de endometritis clínica y de ES	80	
4.3.2.4 Evaluación de estructuras ováricas y de la presencia de fluido uterino	83	
4.3.2.5 Análisis estadístico	84	
4.5 RESULTADOS	84	

4.6 DISCUSIÓN.....	84
4.7 CONCLUSIONES.	87
5. CONCLUSIONES GENERALES.....	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
ANEXOS	108
Anexo 3.1 Distribución proporcional de las muestras de vacas lecheras con MET (n=46) y sin MET (n=46), según los títulos neutralizantes e inhibición porcentual para diarrea viral bovina (VDVB) y para rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR).	108
Anexo 3.2 Títulos séricos para <i>Neospora caninum</i> (<i>N. caninum</i>) en vacas lecheras con MET (n=46) y sin MET (n=46).....	110

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
ARN	Ácido ribonucleico
BoHV-1	Herpes virus bovino tipo 1
CC	Condición corporal (escala 1-5)
d	días
DEL	Días en leche
DE	Desvío estándar
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción
ENUT	Enfermedades no uterinas: mastitis clínica y cojera clínica
ES	Endometritis subclínica
EUT	Enfermedades uterinas: retención de placenta, metritis, endometritis clínica y piometra
IA	Inseminación artificial
IBR	Rinotraqueitis infecciosa bovina
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucles
LECHE	Producción de leche

MET	Muerte embrionaria tardía
<i>N. caninum</i>	Neospora caninum
No-MET	Vacas sin muerte embrionaria tardía
P4	Progesterona
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
Post-IA	Después de la inseminación artificial
RP	Razón de probabilidad (OR, odds ratio)
SF	Servicio fecundante
TRI	Tasa de riesgo instantáneo de preñez (HR, Hazard Ratio)
US	Ultrasonografía
VN	Virus neutralización
VDVB	Virus de la diarrea viral bovina

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Modelo logístico univariable que evalúa los factores de riesgo de muerte embrionaria tardía (MET) en vacas lecheras (n=3155).	43
Tabla 2.2. Modelo logístico multivariable que evalúa los factores de riesgo de muerte embrionaria tardía (MET) en vacas lecheras (n=3155).	45
Tabla 3.1. Modelo logístico univariable que evalúa la asociación de títulos séricos para VDVB, IBR y <i>N. caninum</i> con las chances de muerte embrionaria tardía (MET) en vacas lecheras con MET (n= 92).....	67
Tabla 3.2. Modelo logístico univariable que evalúa la asociación de la seroconversión a VDVB, IBR y <i>N. caninum</i> con las chances de muerte embrionaria tardía (MET) en vacas lecheras (n= 92).....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Imagen ecográfica de una muerte embrionaria tardía (MET).	24
Figura 2.1. Asociación entre la muerte embrionaria tardía (MET) y el intervalo parto - parto en vacas lecheras (n= 631 casos y 2524 controles).	47
Figura 3.1 Esquema del muestreo a campo en vacas lecheras con MET (n=46) y sin MET (n=46).	56
Figura 3.2 Microfotografía de taquizoitos de <i>N. caninum</i> mediante IFI.....	62
Figura 3.3. Métodos diagnósticos utilizados en la detección de VDVB, IBR y <i>N. caninum</i> en vacas lecheras con MET (n=46) y sin MET (n= 46).....	63
Figura 4.1. Intervalo de tiempo hasta la preñez en vacas lecheras antes de la MET (PRE-MET, n= 642) y después de padecer un evento de muerte embrionaria tardía (POS-MET, n= 517).....	79
Figura 4.2 Fotografías del instrumental utilizado en el estudio para realizar el cepillado del endometrio. A) pistola armada y por debajo, las partes que la forman; B) porción anterior de la pistola, donde se observa el cepillo y la vaina que lo recubre.	82
Figura 4.3 Fotografías del procesamiento de la muestra en el laboratorio. A coloración del extendido con tinción 15; B secado de las muestras.	82
Figura 4.4 Microfotografía de un extendido de citología endometrial.	83

TITULO: MUERTE EMBRIONARIA TARDÍA EN VACAS DE TAMBO

Palabras claves: Muerte embrionaria tardía, ultrasonografía, eficiencia reproductiva, vaca lechera.

RESUMEN

En esta tesis se realizaron tres estudios observacionales, uno de caso-control para evaluar los factores de riesgo asociados a muerte embrionaria tardía (MET) y su impacto sobre la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras; otro de cohorte prospectivo para evaluar la asociación entre (seroprevalencia y seroconversión) de los virus de la diarrea viral bovina (VDVB), de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR) y *Neospora caninum* (*N. caninum*), y la concentración de progesterona (P4) en sangre con el riesgo de MET y, por último, un estudio transversal para determinar la salud uterina, la actividad ovárica y la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras después de la MET. En el primer estudio se observó que el riesgo de MET fue mayor en vacas multíparas y con una condición corporal (CC) menor a 2,5 al momento de la MET, y que la MET alarga 108 d el intervalo parto – parto. En el segundo estudio se observó que la seroconversión a VDVB se asocia con la chance de MET y, además, se detectó el VDVB en el *conceptus* de las vacas que seroconvirtieron. En el tercer estudio se detectó un 21% de vacas con endometritis subclínica (ES), un 17% con fluido uterino y un 15% con anestro, y, además, que las vacas, dentro de la misma lactancia, tardan 15 días menos en quedar preñadas después de la MET que antes de padecerla. Se concluye que el balance energético, el número de partos y la seroconversión a VDVB son factores de riesgo de MET;

y, además, que el impacto negativo de la MET sobre la eficiencia reproductiva se debería a que las vacas deben preñarse dos veces dentro de la misma lactancia.

TITLE: LATE EMBRYONIC LOSSES IN DAIRY COW

Keyword: late embryo loss, ultrasonography, reproductive performance, dairy cow

SUMMARY

This thesis involved three observational studies: a case-control study to evaluate the risk factors associated with late embryonic loss (LEL) and its impact on the reproductive efficiency of dairy cows; a prospective cohort study to evaluate the association between (seroprevalence and seroconversion) of bovine viral diarrhoea viruses (BVDV), infectious bovine rhinotracheitis (IBR) and *Neospora caninum* (*N. caninum*), and the concentration of progesterone (P4) in the blood with the risk of LEL in dairy cows and, finally, a cross-sectional study to determine uterine health, ovarian activity and reproductive efficiency of dairy cows after LEL. In the first study, it was observed that the risk of LEL was higher in multiparous cows with body condition score lower than 2,5 at the time of LEL, and that LEL lengthens the calving-calving interval by 108 d. In the second study, it was observed that seroconversion to BVDV is associated with the odds for LEL and, in addition, that BVDV was detected in the *conceptus* of the cows that had seroconverted. In the third study, it was observed, 14 d after LEL, that 21% of cows had subclinical endometritis, 17% of cows had uterine fluid and that 15% of cows had anestrus. Also, it was found that cows take 15 days less to become pregnant after LEL than before suffering it within the same lactation. It is concluded that parity, postpartum energy balance, and the seroconversion to BVDV are risk factors for LEL in dairy

cows; and, furthermore, that the negative impact of LEL on reproductive efficiency is due to the fact that dairy cows must get pregnant twice within the same lactation to deliver a calf.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Existe acuerdo general en que la eficiencia reproductiva de las vacas desempeña un papel importante en el éxito comercial y económico de los rodeos lecheros (De Vries, 2006). En las últimas décadas, el aumento en la producción de leche se ha acompañado de una disminución en los índices reproductivos de las vacas (Rearte y col., 2018). Entre los distintos factores que pueden alterar la eficiencia reproductiva, podemos mencionar el anestro, la ineficiencia en la detección de celo, el bajo porcentaje de preñez y las pérdidas de gestación (Santos y col., 2009). Esta última, la pérdida de gestación, es una de las principales causas de ineficiencia reproductiva en los rodeos lecheros porque alarga el intervalo entre partos, incrementa la tasa de refugos y el requerimiento de vaquillonas de reemplazo, y también porque aumenta los costos asociados con la alimentación, los chequeos veterinarios, los tratamientos y el número de inseminaciones artificiales (IA) (De Vries, 2006; Lee y Kim, 2007; Wiltbank y col., 2016).

1.2 Clasificación de las pérdidas de gestación

En los bovinos la gestación tiene una duración aproximada de 280 días (d), pudiendo ocurrir pérdidas a lo largo de toda la preñez (Silke y col., 2002). La Comisión de nomenclatura reproductiva bovina (1972) estableció que el período

embrionario se extiende desde la concepción hasta el final de la etapa de diferenciación, aproximadamente a los 42 d de gestación, y que el período fetal abarca desde los 43 d hasta el parto (López-Gatius y col., 2004b). Basándose en esta diferenciación, Walsh y col. (2011) establecieron una clasificación de pérdida de gestación en tres periodos: 1^{ro}) muerte embrionaria muy temprana (0 - 7 d de gestación), 2^{do}) muerte embrionaria temprana (8 - 24 d de gestación) y 3^{ro}) MET (25 - 42 d de gestación) y muerte fetal (>43 d de gestación).

Por otro lado, el primer trimestre de gestación también ha sido clasificado en cuatro períodos de acuerdo a los acontecimientos fisiológicos característicos y a las posibles causas de pérdida de gestación de cada etapa: 1^{ro}) Comprende la fertilización, activación del genoma embrionario y el desarrollo del blastocisto (0-7 d de gestación), 2^{do}) Abarca el proceso de elongación del embrión, reconocimiento materno de la gestación y mantenimiento del CL por el interferón tau (8-27 d de gestación), 3^{ro}) Comprende el desarrollo de los placentomas, comienzo de la nutrición placentaria y crecimiento embrionario (28-60 d de gestación) y 4^{to}) Finalmente, el último periodo abarca el crecimiento embrionario y fetal, y se caracteriza por el aumento en el flujo sanguíneo uterino debido a cambios fisiológicos (Wiltbank y col., 2016).

1.3 Caracterización diagnóstica de las pérdidas de gestación

Actualmente, los métodos utilizados para detectar las pérdidas de la gestación incluyen: 1) la identificación de vacas que retornan al celo después del servicio (Santos y col., 2009; Silke y col., 2002); 2) la US en modo B para el

diagnóstico de gestación a partir del día 25 post-IA (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010); 3) la evaluación de la concentración de progesterona (P4) en sangre y leche entre los 20 - 24 d post-IA (Ealy y Seekford, 2019); 4) la evaluación de la concentración de glicoproteínas asociadas a la preñez (PAG) a partir del día 24 post-IA (Engelke y col., 2015; Ealy y Seekford, 2019); 5) la detección de micro ARN vinculados a la preñez a partir del día 18 post-IA (Pohler y col., 2017); 6) la cuantificación de genes estimulados por el interferón tau en muestras de sangre periférica 18 - 22 d post-IA (Ahmad y col., 2018) y 7) la evaluación de la perfusión sanguínea del cuerpo lúteo (CL) a través del uso de la ultrasonografía Doppler entre los 19 - 22 d post-IA (Pugliesi y col., 2019). Si bien, estas herramientas diagnósticas brindan valiosa información sobre las posibles pérdidas de preñez, muchas de ellas requieren de equipos y métodos especializados muy costosos, por lo que no se utilizan de rutina en establecimientos comerciales. Por el contrario, el uso de la US en modo B para el diagnóstico de gestación a partir del día 25 post-IA y el registro de vacas que no retornan al celo después de la IA son herramientas diagnósticas prácticas de pérdidas de gestación a nivel de campo.

En el caso de la MET, el diagnóstico es posible gracias al uso rutinario de la US (25 - 42 d post-IA), y se diagnostica cuando el embrión no tiene latidos cardíacos, o cuando se evidencian membranas desprendidas o estructuras flotantes como los restos del *conceptus* (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010). Figura 1.1.

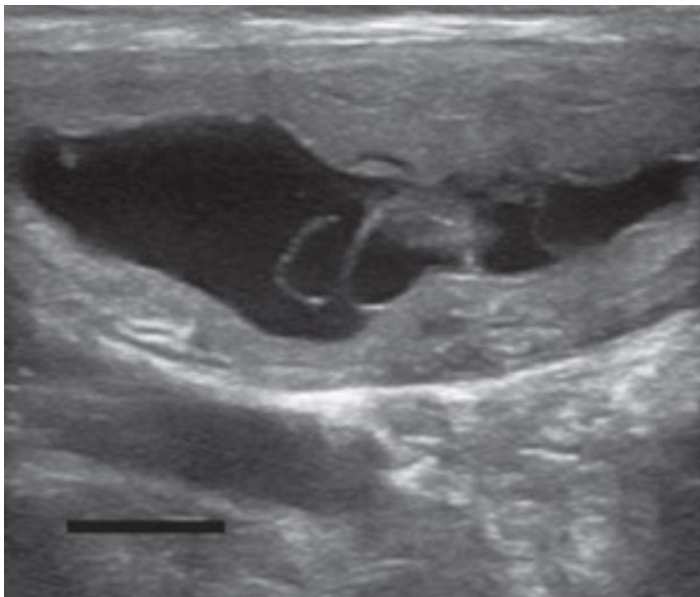


Figura 1.1 Imagen ecográfica de una muerte embrionaria tardía (MET).

1.4 Incidencia de MET

De acuerdo a lo reportado en distintas partes del mundo (Egipto, Estados Unidos, Irlanda, Corea del Sur y Argentina), la incidencia de pérdidas de la gestación varía de 3,2% hasta 29% para el rango comprendido entre los 25 y 90 d post-IA, dependiendo de la región, el ambiente y el manejo de las vacas lecheras (Cartmill y col., 2001; Lee y Kim, 2007; Quintero Rodríguez y col., 2019; Silke y col., 2002; Wiltbank y col., 2016). Así mismo, se ha indicado que la mayor parte de las pérdidas de la gestación en vacas lecheras ocurren durante los primeros 60 d después de la inseminación artificial (post-IA) (Wiltbank y col., 2016). Del mismo modo, algunos reportes estimaron pérdidas entre un 35 - 45% hasta los 25 d post-IA (muerte embrionaria muy temprana y temprana) (Santos y col., 2004; Walsh y col., 2011), y pérdidas cercanas al 3,2% (28-42 d post-IA, MET) (Silke y col., 2002).

1.5 Causas de MET

Se ha reportado que las causas de MET en las vacas lecheras pueden ser de origen multifactorial (Quintero Rodriguez y col., 2019; Silke y col., 2002). Es de resaltar, que existe poca información específica de MET, y que en algunos casos se mencionan estudios realizados de pérdidas de la gestación que abarcan otros periodos de tiempo (muerte embrionaria temprana y muy temprana, <28 d post-IA y muerte fetal, > 45- d post-IA). Si bien, la MET puede detectarse a partir del día 25 post-IA, en este trabajo de tesis se determinó a partir del día 28 post-IA debido a cuestiones propias del manejo reproductivo del establecimiento. A los fines prácticos las causas pueden clasificarse en:

1.5.1 Causas no infecciosas

Es posible que las pérdidas de gestación y la MET de origen no infeccioso sean subdiagnosticadas, debido a que pasan inadvertidas, y en la mayoría de los casos no se realizan pruebas complementarias para confirmar los diagnósticos (Campero y col., 2017). Diversos factores pueden estar involucrados.

1.5.1.1 Factores ambientales

Se ha reportado que las condiciones medioambientales y la estación del año pueden afectar la fertilidad de vacas lecheras (García-Ispierto y col., 2006). En este sentido, en Estados Unidos y en la India se ha observado que la hipertermia genera cambios en el ambiente uterino de las vacas, afecta la calidad de los ovocitos y el desarrollo embrionario, lo que ocasiona fallas en la implantación y muerte embrionaria temprana (<25 d post-IA) (Paula-Lopes y Hansen, 2002; Khan y col.,

2013). También, en España, García-Ispuerto y col., (2006) reportaron que la alta temperatura y la humedad son factores de riesgo de pérdida de gestación (21 - 30 d post-IA). Por otro lado, en Italia se reportó que la tasa de preñez en vacas lecheras inseminadas en el invierno fueron mayores (81%) que las inseminadas en el verano (56,3%) (Alnimer y col., 2002).

1.5.1.2 Factores nutricionales

La alteración de la nutrición conduce a un desbalance energético que puede llegar a ocasionar fallas reproductivas en vacas lecheras después del parto (Giuliodori y col., 2011, 2013a). Estos desbalances alteran los niveles sanguíneos de metabolitos y hormonas encargadas de regular la actividad ovárica, el ambiente uterino y el sistema inmunológico (Lucy y col., 2014). Una herramienta para evaluar el estado nutricional en vacas lecheras es la CC, esta consiste en apreciar la cantidad de energía almacenada en forma de grasa subcutánea en los animales y darles una puntuación del 1 a 5, donde 1 es emaciada y 5 es obesa (Ferguson y col., 1994). Es decir, bajas CC indicarían que los animales han consumido menos energía de la requerida durante un período prolongado (semanas a meses). En Estados Unidos se ha reportado que vacas con CC menor a 3 postparto tienen una tasa de preñez 12,8% menor al día 32 post-IA en comparación con vacas que registraron una CC mayor a 3 (Ribeiro y col., 2013). Del mismo modo, en Irlanda se ha indicado que vacas con CC menor a 2,75 registraron 6,9% más de pérdida de gestación con respecto a vacas que tenían una CC mayor a 3,50 entre los 2 - 56 d post-IA (Silke y col., 2002).

1.5.1.3 Factores productivos

Existe consenso en que la eficiencia reproductiva está asociada negativamente con la producción de leche en las vacas de alto rendimiento (Rearte y col., 2018). A su vez, las pérdidas de la gestación varían con el número de lactancias de la vaca. En este sentido, Lee y Kim, (2007) reportaron que vacas de tercera lactancia tuvieron un mayor riesgo de pérdida de la gestación que en las lactancias previas, y a su vez, produjeron más leche que las vacas de primer y segundo parto. En este sentido, Ruprechter y col. (2020) indicaron que vacas primerizas tuvieron mayores concentraciones del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 y mejores tasas de preñez que vacas multíparas 45 d post-IA (74% vs 54%, respectivamente). También, Elischer y col. (2015) reportaron que vacas primerizas tuvieron un mayor potencial antioxidante con respecto a vacas multíparas durante el periodo postparto. En cuanto a las pérdidas de la gestación, en Corea del Sur reportaron que vacas lecheras primerizas tuvieron menos chance de perder la gestación que vacas multíparas (Lee y Kim, 2007).

1.5.1.4 Factores hormonales

La progesterona (P4) es la responsable de mantener las funciones endometriales claves para la supervivencia embrionaria, el crecimiento del *conceptus*, la implantación y la placentación (Spencer y col., 2016). Lonergan, (2011) indicó que en las vacas lecheras en lactancia se produce un mayor flujo sanguíneo al hígado y esto incrementa el metabolismo hepático de los esteroides, lo que se asocia a una disminución en la concentración de P4 en sangre en relación con los factores mencionados en el apartado anterior. En este sentido, López-Gatius

y col. (2004c) indicaron que vacas lecheras suplementadas con progesterona exógena tuvieron 2,4 veces menos chances de perder la gestación (36 - 42 d post-IA) con respecto a vacas control. También, Ahmad y col., (2018) reportaron que los bajos niveles de P4 en sangre se asocian con la presentación de MET (24 - 42 d post-IA) en las vacas lecheras.

1.5.1.5 Enfermedades uterinas y no uterinas

Se ha postulado que algunos desordenes metabólicos pueden alterar la eficiencia reproductiva de vacas lecheras (Ribeiro y col., 2013). En este sentido, Alawneh y col. (2011) indicaron que vacas diagnosticadas con cojeras clínicas que tuvieron MET y muerte fetal entre los 35 y 90 d post-IA tardaron 12 d más en quedar preñadas con respecto a vacas sanas. También, Risco y col. (1999) encontraron que vacas con mastitis clínica durante los 45 d post-IA tuvieron 2,7 más riesgo de perder la gestación dentro de los próximos 90 d en comparación con vacas sanas. Por consiguiente, Ribeiro y col. (2013) propusieron agrupar a las enfermedades postparto según su presentación en: enfermedades uterinas (EUT: metritis, endometritis, retención de placenta) y enfermedades no uterinas (ENUT: mastitis, cojeras, problemas digestivos y respiratorios). Un estudio llevado a cabo en Estados Unidos indicó que vacas diagnosticadas con enfermedades EUT y ENUT presentaron cambios de tipo inflamatorio en el transcriptoma celular a nivel fetal y registraron un aumento del 13% en la incidencia de pérdida de la gestación entre los 45 y 280 d post-IA (Ribeiro y col., 2016).

1.5.1.6 Otras causas

Se ha postulado que la expresión de algunos genes recesivos indeseables puede alterar la eficiencia reproductiva en vacas lecheras (VanRaden y col., 2011). En tal sentido, Lazzari y col., (2011) indicaron que el genotipo embrionario y la alta endogamia afectan el metabolismo de los aminoácidos, la expresión génica y el desarrollo previo a la implantación.

También, se ha reportado que la administración de fármacos y especialmente la vacunación de animales gestantes pone en riesgo la continuidad de la gestación. En este sentido, Ferreira y col., (2016) en Brasil y Marqués y col. (2019) en Argentina han observado que las pérdidas de la gestación temprana (31 - 33 d post-IA) aumentan 4 y 2,8 veces en vacas que habían sido previamente vacunadas contra la fiebre aftosa.

1.5.2 Causas infecciosas

Existe acuerdo en que las pérdidas de la gestación son frecuentes en todo el mundo (Cartmill y col., 2001; Lee y Kim, 2007; Quintero Rodríguez y col., 2019; Silke y col., 2002; Wiltbank y col., 2016). Por tanto, Campero y col. (2017) indicaron que toda pérdida reproductiva debería considerarse de origen infeccioso hasta que se demuestre lo contrario. En Argentina los primeros reportes realizados sobre la etiología de las pérdidas reproductivas en bovinos fueron recopilados por el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado (SDVE) del INTA Balcarce. En este sentido, este centro de diagnóstico reportó la presencia de diversos microorganismos como bacterias (*Brucella abortus*, *Campylobacter fetus*, *Leptospira spp*, *Escherichia coli*, *Pasteurella spp*, *Trueperella pyogenes*), virus

(VDVB e IBR) y protozoarios (*Tritrichomonas foetus*, *N. caninum*) en fetos bovinos abortados (Campero y col., 2003; Villar, 1982). A continuación, se detallan las enfermedades infecciosas que fueron seleccionadas para este trabajo de tesis como posibles causas de MET.

1.5.2.1 Neospora caninum (*N. caninum*)

N. caninum es un protozoario intracelular obligado del filo Apicomplexa, que está considerado como una de las principales causas infecciosas de pérdidas fetales en vacas lecheras (Moore y col., 2013; da Silva Silveira y col., 2019). Este parásito posee un ciclo heteroxeno en donde los hospedadores definitivos son los perros, lobos, coyotes y dingos, que eliminan ooquistes infecciosos en la materia fecal (Dubey y col., 2007), de manera que horizontalmente puede transmitirse por vía digestiva a los bovinos (hospedador intermediario) (Dubey y Schares, 2011). A su vez, en los bovinos se transmite por vía transplacentaria, donde han encontrado una seropositividad de 40 a 95% (Reichel y col., 2014). Estudios llevados a cabo en diferentes países (Uruguay, Argentina, Brasil, México) indican que la prevalencia en los rodeos lecheros oscila entre el 14 y el 42% (Bañales y col., 2006; Fort y col., 2015; Garcia-Vazquez y col., 2005; Pessoa y col., 2016). En Brasil se reportó que vacas lecheras seropositivas a *N. caninum* presentan una mayor incidencia de pérdidas de la gestación con respecto a vacas seronegativas (40 vs. 4,1%, respectivamente) durante los 35 - 270 d post-IA (Pessoa y col., 2016). También, en Argentina se ha encontrado que el 43,3% de vacas lecheras que habían abortado tenían serología positiva para *N. caninum* (Moore y col., 2002).

1.5.2.2 Virus de la Diarrea Viral Bovina (VDVB)

El virus de la VDVB pertenece a la familia *Flaviviridae* y al género Pestivirus, y se clasifica en dos genotipos (VDVB tipo 1 y VDVB tipo 2) (Bauermann y col., 2013). A su vez, ambos genotipos virales se pueden dividir en dos biotipos, cepas citopáticas (CP) y no citopáticas (NCP) dependiendo del efecto que producen en las líneas celulares (Traveria y col., 2011). Estudios llevados a cabo en diferentes países (Etiopía, Bangladesh, Lituania, Argentina) indican que la seroprevalencia de los rodeos lecheros para el VDVB varía de 32,6% a 90,7% (Aragaw y col., 2018; Mockeliuniene y col., 2004; Odeon et al., 2001; Uddin y col., 2017). En este sentido, Bauermann y col. (2013) indicaron que la cepa NCP del VDVB perteneciente a los genotipos 1 y 2 altera la eficiencia reproductiva de las vacas puesto que genera fallas en la fertilización, retorno al celo, abortos y nacimiento de crías persistentemente infectadas. También, en Suiza se ha reportado que la tasa de muerte fetal (45 - 210 d post-IA) en vacas con seroconversión al VDVB es mayor que la registrada en vacas seronegativas (15.8% vs. 6.1%, respectivamente) (Rüfenach y col., 2001).

1.5.2.3 Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR)

La IBR es causada por el Herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) perteneciente a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae* (Newcomer y col., 2017). Estudios llevados a cabo en diferentes países (Estonia, Etiopía, Bélgica, Argentina) han informado una seroprevalencia entre el 20% al 95% en bovinos (Muylkens y col., 2007; Raaperi y col., 2014; Sibhat y col., 2018; Odeon y col., 2001). Se conoce que el BoHV-1 puede diseminarse por vía sistémica y que puede

llegar al feto atravesando la barrera placentaria (Muylkens y col., 2007). En Etiopía, reportaron que vacas seropositivas a IBR tuvieron mayores chances de padecer trastornos reproductivos como abortos, retención de placenta, muerte fetal, nacimiento de terneros débiles y metritis en comparación con vacas seronegativas (Sibhat y col., 2018). También, en Estonia se registró que vacas seropositivas a IBR tuvieron 7,3 más chance de abortar que las vacas seronegativas (Raaperi y col., 2012).

1.5.3 Salud uterina y eficiencia reproductiva post MET

Lograr un servicio fecundante (SF) de manera oportuna es fundamental para mantener la eficiencia reproductiva en los rodeos lecheros (Inchaisri y col., 2010). Por tanto, identificar las causas que alteren la concepción en vacas lecheras que padecieron MET sería de gran utilidad para conocer su futura fertilidad.

Está demostrado que la eficiencia reproductiva puede verse alterada por procesos infecciosos o inflamatorios que involucran al útero (Sheldon y col., 2009; Giuliadori y col., 2013a). La ES es una de las principales enfermedades que disminuye la fertilidad en vacas lecheras (Madoz y col., 2012). En Argentina, se reportó una prevalencia de ES del 17% y, a su vez, se asoció a efectos negativos sobre la eficiencia reproductiva (Madoz y col., 2013). En este sentido, Hill y Gilbert, (2008) realizaron un estudio in vitro y encontraron que la ES altera la calidad y la supervivencia embrionaria. También, Lima y col. (2013) reportaron que vacas con ES dentro de los 46 DEL tuvieron un 30,4% más de pérdidas de gestación entre los 32 y 45 d post-IA que las vacas sin ES. Si bien, está demostrado que la ES altera la eficiencia reproductiva, a nuestro conocimiento estas aseveraciones no han

sido verificadas en vacas lecheras que padecieron MET. Por otra parte, Jaureguiberry y col. (2016) reportaron que el uso de la US es de gran utilidad para detectar en vacas repetidoras la presencia de fluido en la luz uterina, el cual podría estar relacionado con una menor fertilidad. El otro aspecto para considerar es conocer la funcionalidad ovárica en vacas que padecieron MET. En este sentido, Bartolome y col., (2005) indicaron que el uso de la US es fundamental para evaluar la actividad ovárica en vacas lecheras.

En consecuencia, está demostrado que la salud uterina y la funcionalidad ovárica son fundamentales para el éxito reproductivo en los rodeos lecheros. Lo que se desconoce completamente es el estado de la salud uterina, la actividad ovárica y la eficiencia reproductiva de las vacas después de haber padecido un episodio de MET.

De lo expuesto anteriormente se destaca que existen muy pocos estudios a nivel mundial, que los pocos que hay son difíciles de comparar porque utilizan diferentes diseños experimentales y abarcan distintas ventanas de tiempo durante la gestación; es decir, que no son específicos de MET, y que, además, están realizados en sistemas productivos muy diferentes. Sumado a esto, no se han realizado estudios en Argentina, lo que evidencia la importancia de conocer la incidencia de MET, cuáles son los factores de riesgo asociados y, finalmente, qué impacto reproductivo tiene en las vacas lecheras.

Dado lo anterior, los tres objetivos de esta tesis fueron:

- 1) Evaluar los factores de riesgo asociados a la muerte embrionaria tardía (MET) y su impacto en la eficiencia reproductiva;
- 2) Evaluar la asociación entre la

seroprevalencia y seroconversión del VDVB, IBR y *N. caninum* con el riesgo de MET, y la concentración de P4 en sangre en vacas con MET y sin MET; 3) Determinar la salud uterina, actividad ovárica y la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras después de la MET.

Para cumplir con estos tres objetivos se realizaron tres estudios observacionales que se describen en los capítulos siguientes. Todas las prácticas en animales fueron aprobadas bajo el Protocolo para el Uso de Animales de Investigación Científica del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Buenos Aires, Argentina. (Identificación interna N° 62-2-17T).

CAPÍTULO 2: MUERTE EMBRIONARIA TARDÍA: FACTORES DE RIESGO Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA

2. INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva de las vacas lecheras es uno de los pilares fundamentales para que un rodeo lechero sea productivo y económicamente viable (De Vries, 2006). Como se mencionó anteriormente, distintos factores pueden alterar la eficiencia reproductiva, dentro de éstas, la MET (25 - 42 d post-IA) es una de las causas más importantes debido a que alarga el intervalo parto-concepción (Silke y col., 2002). Este problema es incluso peor en los sistemas de producción estacionales, puesto que es prácticamente imposible volver a preñar la vaca después de la pérdida (De Vries, 2006; Walsh y col., 2011). En este sentido, Wiltbank y col., (2016) indicaron que la mayoría de las pérdidas de la gestación ocurren durante los primeros 60 d de preñez, que comprende las etapas embrionaria (≤ 42 d post-IA) y fetal temprana (≥ 43 d post-IA).

Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico de muerte embrionaria antes de los 25 d post-IA requiere de métodos mucho más especializados y, por lo que no es posible realizarlo en condiciones comerciales. Por el contrario, el diagnóstico de MET a campo es factible gracias a que el uso rutinario de la US para el diagnóstico temprano de la gestación.

Distintos estudios que evaluaron los factores de riesgo asociados han encontrado que el estrés por calor se asocia con pérdidas de gestación y con bajas tasas de preñez en vacas mestizas de España e India (García-Ispierto y col., 2006;

Khan y col., 2013). Estudios llevados a cabo en diferentes países (Irlanda, Estados Unidos, Corea del Sur y Egipto) han reportado que el número de partos de la vaca puede asociarse con la tasa de pérdidas de gestación (El-tarabany, 2016; Lee y Kim, 2007; Sartori y col., 2004; Silke y col., 2002). Por otro lado, estudios realizados en Irlanda y Bélgica han encontrado que los altos niveles de producción de leche y un pobre estado nutricional acompañado de baja condición corporal (CC) se relacionan con pérdidas de gestación (Diskin y col., 2006; Silke y col., 2002). Por último, estudios llevados a cabo en diferentes países (Irlanda, Italia, Irán y Estados Unidos) indican que la presencia de enfermedades uterinas como la metritis, la endometritis, la piómetra, la retención de placenta, e incluso aquellas enfermedades no uterinas como la mastitis y las cojeras clínicas pueden ocasionar muerte embrionaria y fetal temprana (Celi y col., 2011; Mokhtari y col., 2016; (Perry y col., 2005; Ribeiro, y col., 2016). Si bien, los estudios anteriormente mencionados aportan un panorama general del problema en los establecimientos lecheros, no existen hasta el momento otros estudios realizados en Argentina que indiquen la incidencia y los factores de riesgo específicos para la MET detectada por US dentro del período comprendido entre los 28 - 42 d post-IA.

2.1 OBJETIVOS

Los objetivos de este capítulo fueron:

- a. Estimar la incidencia de la MET en vacas lecheras.
- b. Evaluar la asociación entre MET y eficiencia reproductiva en vacas lecheras.
- c. Evaluar los factores de riesgo asociados a la MET en vacas lecheras.

2.2 HIPÓTESIS

Las hipótesis más relevantes de este capítulo fueron:

- a. La incidencia de MET es similar a la encontrada en otros trabajos.
- b. La MET reduce la eficiencia reproductiva en los rodeos lecheros.
- c. La MET se asocia con un mayor número de partos, con el estrés térmico del verano, con las enfermedades clínicas, con el balance energético negativo, y con una mayor producción de leche en vacas lecheras.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Selección y manejo de los animales

El estudio se realizó en un tambo comercial, ubicado en Carlos Casares, provincia de Buenos Aires, Argentina (35 ° 37 ' S, 61 ° 22 ' W) que posee una extensión de 2000 hectáreas y 2600 vacas de raza Holstein en ordeño, bajo un sistema de producción de base pastoril con alta suplementación. El promedio de producción de leche del establecimiento es de 9,600 kg por vaca por lactancia. Las vacas lactantes permanecían en pastoreo en potreros rotativos y eran suplementadas con concentrado y ensilaje. La dieta total de las vacas lactantes se basaba en 50% de pasturas y verdeos (alfalfa y gramíneas de invierno), 25% de concentrado y 25% de ensilaje de maíz. Las pasturas estaban constituidas por alfalfa y gramíneas de invierno. El pastoreo consistía en rotación de potreros tanto en la mañana como en la tarde. El concentrado contenía 60% de granos de maíz y 40% harina de soja. Los animales fueron suplementados cuatro veces al día, dos veces en la sala de ordeño (concentrado) y dos veces en los potreros (mezcla ensilaje de maíz).

Con respecto al manejo reproductivo, los partos ocurrían a lo largo del año y el periodo de espera voluntario establecido por el establecimiento era de 50 d. La detección de celo se realizaba dos veces por día (durante el ordeño), utilizando pintura en la base de la cola considerándose una vaca en celo cuando había perdido el 50% de la pintura. El diagnóstico de gestación se realizó a través de ecografía transrectal con un transductor lineal de 7,5 MHz (Esaote Tringa Linear Vet, Pie Medical, Holanda) entre los 28 - 42 d post-IA.

El plan sanitario para prevenir enfermedades reproductivas se basó en la aplicación de una vacuna de suspensión acuosa inactiva de BoHV-1, VDVB tipos 1 y 2, cepas bacterianas de *Campylobacter fetus fetus*, *Campylobacter fetus venerealis* y *Histophilus somni* (Bioabortogen® H - Biogénesis-Bagó). Para esto, se vacunaron todas las vacas dos veces por año (marzo y octubre).

Para finalizar, el principal criterio para descartar los animales en el establecimiento se basó en su nivel de producción de leche.

2.3.2 Definición de las enfermedades

El diagnóstico de metritis, endometritis y piómetra fue realizado por el veterinario a cargo del establecimiento, mientras que la detección de retención de placenta, mastitis clínica y cojeras fue realizada por personal entrenado del establecimiento. Se diagnosticó retención de placenta cuando las membranas fetales no eran expulsadas dentro de las 24 h después del parto (Kelton y col., 1998). Se consideró que las vacas presentaban metritis cuando mostraban flujo vaginal con olor fétido antes de los 21 días en leche (DEL) (Giuliodori y col., 2013a) y endometritis clínica cuando contenían pus en el flujo vaginal a partir de los 21 DEL

(Sheldon y col., 2006). La piómetra se diagnosticó por US como la presencia de secreción purulenta dentro de la luz uterina, en presencia de un cuerpo lúteo persistente y un cuello uterino cerrado (Sheldon y col., 2006). Por otro lado, la mastitis clínica se diagnosticó en vacas que mostraban secreción anormal de leche (coágulos o grumos) en uno o más cuartos (Kelton y col., 1998). La cojera clínica se diagnosticó en las vacas que tenían una marcha anormal atribuible a lesión de una o más patas, independientemente de la etiología o de la duración del evento (Kelton y col., 1998). Finalmente, la MET se determinó cuando a la US el embrión no presentaba latidos cardíacos o se evidenciaban membranas fetales desprendidas o estructuras flotantes en el período comprendido entre los 28 - 42 d post-IA (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010).

2.3.3 Diseño experimental

Para este estudio se utilizó una base de datos que contenía los registros productivos, reproductivos y sanitarios de 13551 lactancias ocurridas entre el 1 de enero de 2011 y el 31 de diciembre de 2015. Para la recolección y extracción de los datos a analizar, se utilizó el software comercial DIRSA (Dirsa S.A., Gonnet, Argentina).

Se realizó un estudio retrospectivo de casos y controles para evaluar los factores de riesgo de la MET (Rothman y col., 2008). El caso se definió en vacas diagnosticadas con MET 28 - 42 d post-IA mediante US, mientras que el control (no caso) se estableció como vacas con diagnóstico positivo de preñez 28 - 42 d post-IA mediante US y que, además, eran reconfirmadas como preñadas al día 90 \pm 7 d post-IA.

Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión de los animales para que los datos productivos y reproductivos fueran considerados válidos: 1- poseer el diagnóstico de preñez entre los 28 - 42 d post-IA.; 2- tener registro de al menos una medición de CC (escala 1-5) antes de los 30 DEL (Ferguson et al. 1994); 3) tener al menos una medición de CC 15 d alrededor de la fecha en que se realizó el diagnóstico de MET; y 4) al menos un registro mensual de producción de leche entre los 28 - 42 d post-IA. Las vacas que no tuvieron MET (controles) debían contar además con una reconfirmación de la preñez a los 90 ± 7 d post-IA. Todas aquellas vacas que tuvieron más de un evento de MET (n= 42) en la misma lactancia fueron excluidas del estudio.

Finalmente, la selección de los casos y controles se realizó a través de un pareo temporal (± 3 d alrededor de la fecha de la IA del servicio fecundante del caso) y fueron seleccionados aleatoriamente cuatro controles por cada caso dentro de cada año de estudio. Los casos que no tenían los cuatro controles correspondientes no fueron incluidos en el estudio.

2.3.4 Análisis estadístico

La asociación de MET (casos vs. controles) con la producción diaria de leche (LECHE) se estimó mediante un modelo de regresión lineal con el Procedimiento Glimmix de SAS (SAS / STAT ver. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC) en el que se utilizó una distribución normal y un enlace identidad. El modelo lineal se ajustó por el efecto cuadrático de los DEL y por el promedio de producción de leche medido a los 148 DEL. Las asociaciones entre la MET con el intervalo

entre partos, con el riesgo instantáneo de preñez y con la chance de no preñez se evaluaron, respectivamente, mediante curva de supervivencia de Kaplan-Meier, análisis de riesgos proporcionales de Cox y regresión logística. El análisis de supervivencia de Kaplan – Meier se realizó con el Procedimiento Lifetest de SAS, el riesgo instantáneo de preñez se estimó con el Procedimiento PHReg de SAS, y la chance de no preñez se estimó con el Procedimiento Glimmix de SAS.

El riesgo de MET se evaluó mediante modelos logísticos con el Proc Glimmix de SAS con distribución binomial y función de enlace logit. Los factores de riesgo potenciales primero se evaluaron como efectos fijos en modelos univariados y luego los predictores con valores de $P < 0,15$ se incluyeron en modelos multivariados. Los factores de riesgo evaluados fueron el año de MET (2011 a 2015), la estación del año (verano vs. otoño vs. invierno vs. primavera), el número de partos (1 vs. 2 vs. ≥ 3), las enfermedades uterinas ([EUT = sí vs. no]: la retención de placenta, metritis, endometritis clínica y piómetra), enfermedades no uterinas ([ENUT = sí vs. no]: mastitis clínica y cojera clínica que ocurrieron entre la IA y el diagnóstico de preñez por US 28 - 42 d post-IA), la condición corporal al parto (CC - PAR, $< 2,75$ vs. $2,75 - 3,25$ vs. $> 3,25$), la condición corporal a la MET (CC - MET, $< 2,50$ vs. $2,50 - 3,00$ vs. $> 3,00$) y todas las interacciones de primer orden. Además, los DEL y LECHE se incluyeron como predictores continuos del riesgo de MET. La modelización de los modelos logísticos multivariados se realizó mediante el método de eliminación manual de variables, con un criterio de exclusión de $P > 0,1$. La significación estadística se estableció en $P < 0,05$ y la tendencia en $P \leq 0,10$.

2.4 RESULTADOS

La incidencia de MET observada fue de 4,7% (n=13551), mientras que la de las enfermedades uterinas y no uterinas fueron del 22 y 23%, respectivamente (Tabla 2.1).

2.4.1 Asociación de MET con la producción de leche y eficiencia reproductiva.

Las vacas que presentaron MET (casos) tendieron a producir más leche que las vacas controles ($32,5 \pm 0,36$ vs. $31,8 \pm 0,17$ kg, $P = 0,10$). Además, los casos tuvieron un intervalo parto concepción más largo (mediana [IC 95%]) (226 [208 – 238] vs. 118 [115 – 122] d, $P < 0,01$, Figura 2.1) y menor riesgo instantáneo de preñez que los controles (TRI = 0,385, IC 95% = 0,346 – 0,429, $P < 0,01$). Finalmente, los casos tuvieron mayores chances de no estar preñadas que los controles (RP = 2,894, IC 95% = 2,368 – 3,536, $P < 0,01$), dado que el porcentaje de vacas vacías a los 200 DEL fue de 26% (164/631) y 11% (281/2524) en casos y controles, respectivamente.

2.4.2 Factores de riesgo para MET

El riesgo de MET se asoció con el número de partos y con una CC menor a 2,5 al momento de la MET ($P < 0,01$, Tabla 2.1). La chance de MET incrementó en vacas con ≥ 3 partos en comparación con las de 1 parto ($P < 0,01$, Tabla 2.2).

La chance de MET aumentó en vacas con CC-MET $< 2,50$ y disminuyó en vacas con CC-MET $> 3,0$ ($P < 0,01$, Tabla 2.2). Por el contrario, el riesgo de MET no se relacionó con el año ($P = 0,99$), con la estación ($P = 0,98$) ni con la condición corporal al parto ($P = 0,95$, Tabla 2.1). La chance de MET no se asoció con las EUT

ni con las ENUT, tampoco con los DEL ni con la LECHE en el modelo multivariable (Tabla 2.2); no obstante, estas variables se asociaron con la MET en el modelo univariable (Tabla 2.1). Finalmente, todas las interacciones de primer orden tuvieron una $P > 0,1$.

Tabla 2.1. Modelo logístico univariable que evalúa los factores de riesgo de muerte embrionaria tardía (MET) en vacas lecheras (n=3155).

		RP ¹	95%IC ²	P
Año ³	2011	Referencia		0,99
	2012	0,965	0,689 – 1,352	
	2013	0,984	0,715 – 1,354	
	2014	0,992	0,717 – 1,371	
	2015	0,958	0,688 – 1,335	
Estación ⁴	Verano	Referencia		0,98
	Otoño	1,036	0,815 – 1,317	
	Invierno	1,039	0,817 – 1,323	
	Primavera	1,054	0,807 – 1,377	
N° partos	1	Referencia		< 0,01
	2	1,505	1,188 – 1,907	

	≥ 3	2,423	1,956 – 3,001	
CC-PAR ⁵	2,75 – 3,25	Referencia		0,95
	< 2,75	1,032	0,837 – 1,273	
	> 3,25	1,037	0,754 – 1,427	
CC-MET ⁶	2,50 – 3,00	Referencia		< 0,01
	< 2,50	2,016	1,488 – 2,731	
	> 3,00	0,821	0,631 – 1,069	
EUT ⁷	No	Referencia		0,04
	Si	1,225	1,010 – 1,487	
ENUT ⁸	No	Referencia		0,04
	Si	1,246	1,011 – 1,535	
DEL ⁹		1,025	1,004 – 1,046	0,02
LECHE ¹⁰		1,136	1,036 – 1,246	0,01

MET: muerte embrionaria tardía definida como la ausencia de latidos cardíacos del embrión o la evidencia de membranas fetales desprendidas o de estructuras flotantes detectadas mediante ultrasonografía transrectal 28 - 42 d post-IA (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010).

¹RP: chance de MET;

²IC: intervalo de confianza del 95%;

³Año: Año de MET (2011 vs. 2012 vs. 2013. 2014 vs. 2015);

⁴Estación: estación de MET (verano vs. otoño vs. invierno vs. primavera);

⁵CC-PAR: puntaje de condición corporal (escala 1-5) durante los primeros 30 DEL;

⁶CC-MET: puntaje de condición corporal (escala 1-5) 30 d antes del diagnóstico de gestación / MET.

⁷EUT: enfermedad uterina diagnosticada después del parto (retención de placenta, metritis, endometritis clínica y piómetra);

⁸ENUT: enfermedad no uterina (mastitis y cojera clínicas) diagnosticadas entre la IA y el diagnóstico de gestación o MET;

⁹DEL: días en leche en el momento del diagnóstico de gestación o MET (28 - 42 d post-IA). Las chances se expresan como el incremento de 21 d sobre la media (148d);

¹⁰LECHE: producción diaria de leche en el último control mensual de leche antes del diagnóstico de gestación o MET (28 - 42 d después de la IA).

Las chances de padecer MET se expresan como el incremento de 1 desvío estándar (DE) (8,49 kg) sobre la media (32,04 kg/d). Esta asociación fue controlada por el ajuste cuadrático de los DEL;

Los predictores que tienen una $P < 0,15$ se ofrecieron al modelo logístico multivariable.

Tabla 2.2. Modelo logístico multivariable que evalúa los factores de riesgo de muerte embrionaria tardía (MET) en vacas lecheras (n=3155).

		RP ¹	95%IC ²	P
Nº partos	1	1		< 0,01
	2	1,531	1,207 – 1,942	
	≥ 3	2,475	1,991 – 3,076	
CC-MET ³	2,50 – 3,00	1		< 0,01
	< 2,50	1,811	1,329 – 2,467	
	> 3,00	0,695	0,531 – 0,910	

MET: muerte embrionaria tardía definida como la ausencia de latidos cardíacos del embrión o la evidencia de membranas fetales desprendidas o de estructuras flotantes detectadas mediante ultrasonografía transrectal 28 - 42 d post-IA (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010).

¹RP: chance para MET;

²IC: intervalo de confianza del 95%;

³CC-MET: puntaje de condición corporal (escala 1-5) 30 d antes del diagnóstico de gestación / MET;

Los predictores incluidos en el modelo multivariable fueron el número de partos, CC-MET, EUT, ENUT, DEL, LECHE e interacciones de primer orden;

Las EUT (retención de placenta, metritis, endometritis clínica y piómetra) se eliminaron del modelo multivariable (RP= 1,090, IC del 95% = 0,886 - 1,341, P=0,42, y no se muestra en la Tabla 2.2;

Las ENUT (mastitis y cojeras clínicas) diagnosticadas entre el diagnóstico de gestación/MET fueron eliminadas del modelo multivariable (RP = 1,009, IC del 95% = 0,988 - 1,030, P = 0,32) y no se muestran en la Tabla 2.2;

LECHE: producción diaria de leche en el último control mensual de leche antes del diagnóstico de la gestación/MET, realizado 28 - 42 d post-IA [media 148 DEL] se eliminó del modelo multivariable (RP = 0,960, IC del 95% = 0,863 - 1,069, P = 0,46) y de la Tabla 2.2. Todas las interacciones de primer orden tuvieron una P> 0,1.

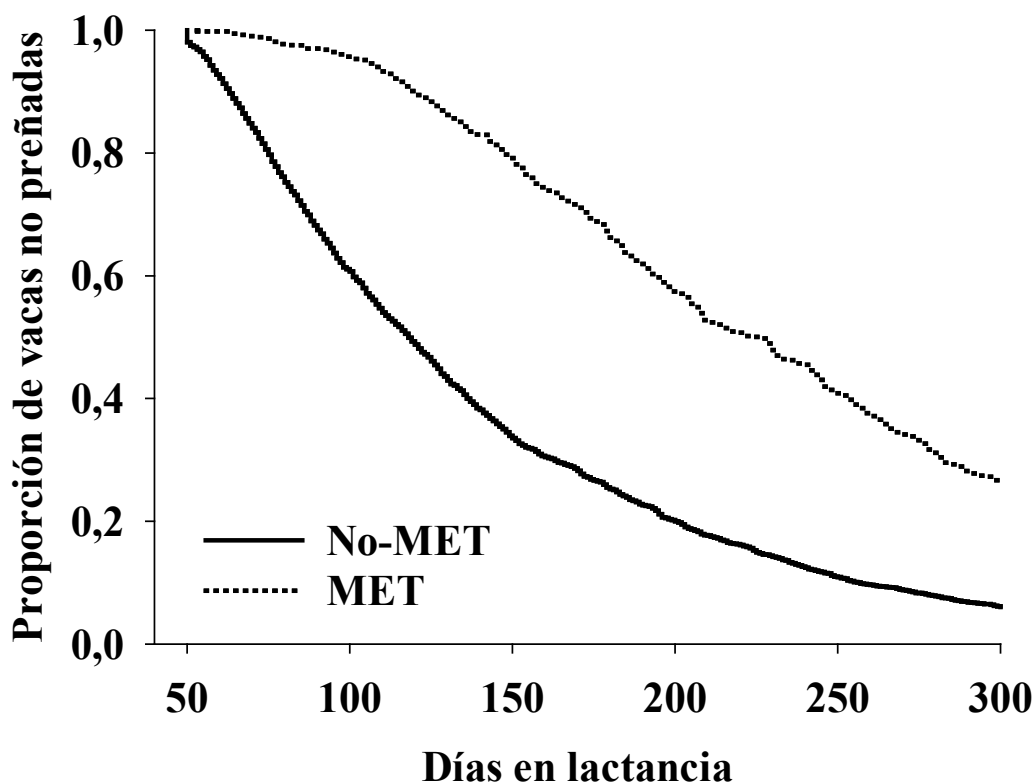


Figura 2.1. Asociación entre la muerte embrionaria tardía (MET) y el intervalo parto - parto en vacas lecheras (n= 631 casos y 2524 controles).

MET: muerte embrionaria tardía definida como la ausencia de latidos cardíacos del embrión o la evidencia de membranas fetales desprendidas o de estructuras flotantes detectadas mediante ultrasonografía transrectal 28 - 42 d post-IA (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010).

No-MET: vacas con diagnóstico positivo de preñez 28 - 42 d post-IA mediante US y que, además, eran reconfirmadas como preñadas al día 90 ± 7 d post-IA.

Las vacas que padecieron MET tuvieron un intervalo entre partos 108 d más largo que las que no sufrieron MET (mediana [IC 95%]: 226 [208 - 238] vs. 118 [115 - 122] d, $P < 0,01$). Además, las vacas con MET tuvieron un riesgo instantáneo de preñez menor que las vacas que no sufrieron de MET (TRI = 0,385, IC del 95% = 0,346 – 0,429, $P < 0,01$).

2.5 DISCUSIÓN

2.5.1 Incidencia de MET

Se observó una incidencia de MET del 4,7% entre los 28 - 42 d post-IA. Estos resultados son similares a lo reportado por Silke y col. (2002) quienes registraron un 3,2% de pérdidas de gestación detectadas por US entre los 28 - 42 d post-IA. Por otro lado, existen otros estudios que reportaron pérdidas de gestación del 5,2% detectadas por US entre los 30 - 58 d post-IA (Santos y col., 2009), del 16,3% detectadas mediante el uso de la concentración de progesterona entre los 30 - 60 d post-IA (Gábor y col., 2008) y del 22% diagnosticadas por US entre los 30 - 70 d post-IA (Abdalla y col., 2017). Si bien, estos estudios mencionados anteriormente han reportado pérdidas de gestación, las diferencias de diseño

experimental, de la ventana de tiempo evaluada (28 - 42 d post-IA vs. 30 - 58 d post-IA vs. 30 - 60 d post-IA vs. 30 - 70 d post-IA) y las herramientas de diagnóstico utilizadas (evaluación con US vs. determinación de progesterona en sangre) dificultan la comparación entre estos diferentes estudios y el nuestro.

2.5.2 Asociación de MET con la eficiencia reproductiva

Se encontró que las vacas con MET tienen un intervalo entre partos 108 d más largo que las que no padecen de MET. Este retraso a la concepción es mucho mayor que el que ocurre en vacas que padecen de EUT como la metritis (20 d de retraso; Sheldon y col., 2006), endometritis clínica (30 a 70 d de retraso; Plöntzke y col., 2011) o ES (30 d de retraso; Madoz y col., 2013). Estas diferencias observadas son difíciles de interpretar, y por tanto no es viable establecer una posible explicación.

2.5.3 Factores de riesgo para MET

Se encontró una asociación entre el riesgo de MET y el número de partos debido a que vacas con 2 o más partos tuvieron mayores chances de MET que las primíparas. Este hallazgo coincide con otros estudios que reportaron una correlación positiva entre vacas multíparas y el riesgo de pérdida de gestación (Lee y Kim, 2007; El-Tarabany, 2016). Una posible explicación podría ser que las vacas multíparas tienen concentraciones más bajas de P4 y estradiol en plasma que las vacas primerizas (Borchardt y col., 2017; Sartori y col., 2004) lo que podría asociarse con una mayor chance de padecer MET. Sin embargo, en otros estudios no se encontró tal asociación (Bamber y col., 2009; Silke y col., 2002).

También, la baja CC-MET (pero no CC-PAR) se asoció con el riesgo de MET, lo que se encuentra en línea con otro estudio que registró que una baja CC en el momento de la IA se asocia negativamente con el porcentaje de preñez al d 32 post-IA (Ribeiro y col., 2013). Del mismo modo, otros autores encontraron que las vacas que perdieron CC tenían una mayor proporción de MET con respecto a las demás que mantenían o ganaban CC después del parto (Silke y col., 2002). Una posible explicación para el vínculo entre una baja CC y el riesgo de MET podría ser a través de la lipólisis que conduce a una alta concentración de ácidos grasos no esterificados (AGNE). En este sentido, durante las últimas décadas, se han demostrado muchos efectos tóxicos directos de la AGNE sobre células como las de la granulosa (Vanholder y col., 2005), ovocitos (Leroy y col., 2012) y embriones en desarrollo (Leroy y col., 2010). Además, la alta concentración de AGNE debido a la producción de leche puede agravar el grado de resistencia a la insulina y prolongar severamente el balance energético negativo, debido a que la energía requerida para la producción de leche y mantenimiento de las funciones tisulares excede la ingesta energética durante este periodo y podría llevar a que la resistencia a la insulina disminuya la sensibilidad del ovario a la LH y a la FSH (Lucy, 2014). No obstante, Mokhtari y col. (2016) no encontraron estas asociaciones.

Por otro lado, las EUT y ENUT no se asociaron con el riesgo de MET, lo que concuerda con Mokhtari y col. (2016) quienes tampoco encontraron esta asociación en vacas lecheras (30 - 68 d post-IA). Por el contrario, Ribeiro y col. (2016) encontraron que vacas con ENUT tuvieron un 9% más de pérdidas de la gestación con respecto a vacas sanas. De la misma manera, reportaron que vacas con mastitis clínica y cojeras tuvieron un mayor riesgo de padecer muerte fetal

(Alawneh y col., 2011; Risco y col., 1999; Santos y col., 2004). Por otra parte, el riesgo de MET no se asocia con la producción de leche. Este hallazgo concuerda con lo reportado por otros trabajos que tampoco encontraron una asociación (Diskin y col., 2006; Silke y col., 2002). No obstante, Wiltbank y col. (2001) comunicaron que las vacas lecheras de alta producción tienen un riesgo mayor de MET y de muerte fetal que las vacas de menor nivel productivo. Por último, el riesgo de MET no se asocia con el año ni con la estación. Contrariamente, otros estudios asocian las altas temperaturas y la humedad ambiental del verano con fallas en la implantación (Khan y col., 2013) y con incremento en las muertes embrionarias hasta los 30 d post-IA (García-Ispuerto y col., 2006). Una posible explicación de nuestros resultados podría deberse a que la mayoría de las pérdidas durante el segundo mes de gestación no se relacionan directamente con el estrés térmico sino con fallas en el desarrollo vascular y formación de los placentomas (Wiltbank y col., 2016).

Es importante resaltar que este es el primer estudio de casos y controles que evalúa los factores de riesgo de MET en las vacas lecheras. Una de las principales ventajas metodológicas de los estudios de casos y controles es que son mucho más eficientes que los estudios de cohorte para evaluar los factores de riesgo de afecciones que afectan una proporción de la población muy baja (Rothman y col., 2008). Además, otra ventaja de este estudio es que involucra un gran número de casos de MET detectados a tiempo real e *in situ* por US en el momento del diagnóstico de gestación; es decir, el embrión estaba muriendo o había muerto recientemente al momento en que se realizaba el diagnóstico. Esto es importante porque los otros estudios publicados hasta el momento se han realizado sobre un

número mucho menor de registros y en su gran mayoría evalúan la muerte embrionaria (y fetal) solamente al momento de la reconfirmación de la preñez. Otra fortaleza del presente trabajo es que se realizó en vacas lecheras en pastoreo con alta suplementación, mientras que los estudios previos en su mayoría involucran vacas en confinamiento o pastoreo solamente.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que el diagnóstico de MET (28 - 42 d post-IA) se realizó cada 14 d, durante las visitas reproductivas al establecimiento, y debido a esto no se incluyeron las vacas con MET en otros momentos diferentes al chequeo reproductivo, por lo que es lógico pensar que la incidencia de MET encontrada puede estar subestimada.

2.6 CONCLUSIONES

Se concluye que el riesgo de MET aumenta en las vacas multíparas y con una CC menor a 2,5 al momento de la MET; que la MET se asocia negativamente con la eficiencia reproductiva, puesto que las vacas que padecen MET tienen un intervalo entre partos 108 d más largo.

CAPÍTULO 3: CAUSAS INFECCIOSAS DE MUERTE EMBRIONARIA TARDÍA EN VACAS DE TAMBO

3. INTRODUCCIÓN

Estudios llevados a cabo por diferentes grupos de investigación han demostrado que enfermedades transmisibles y endémicas como VDVB, IBR y *N. caninum* están asociadas con las pérdidas de gestación en vacas lecheras (Aragaw y col., 2018; Bañales y col., 2006; Fort y col., 2015; Odeon y col., 2001; Pessoa y col., 2016; Raaperi y col., 2014). En este sentido, Rüfenach y col. (2001) encontraron que vacas que habían tenido seroconversión al virus de la VDVB mostraban un 9,7% más de pérdidas fetales (45- 210 post-IA) comparado con las vacas que no seroconvertían. También, Raaperi y col. (2012) reportaron que vacas seropositivas a IBR tienen más chances (RP: 7,3) de padecer abortos con respecto a vacas seronegativas. Del mismo modo, Pessoa y col. (2016) reportaron que vacas seropositivas a *N. caninum* presentan una incidencia mayor de pérdidas de la gestación (35 - 270 d post-IA) que las vacas seronegativas (40 vs. 4,1%, respectivamente).

Es de resaltar, que la mayoría de los estudios mencionados han evaluado las causas infecciosas de muerte fetal, pero ninguno de ellos se ha centrado en las causas de la MET. Con relación a esto, Wathes y col. (2020) indicaron que el período embrionario es crítico debido a que los embriones son especialmente susceptibles a agentes infecciosos a consecuencia de la inmadurez de su sistema inmune y de la acción inmunosupresora de la progesterona.

Si bien, los estudios registrados anteriormente nos informan una perspectiva general del problema, no existen estudios específicos para MET en Argentina que evalúen la seroprevalencia, la seroconversión y la detección molecular de VDVB, IBR y *N. caninum* en el *conceptus* de vacas lecheras. Por otra parte, no existe información acerca de la determinación de la concentración de P4 en sangre al momento de la MET (28 - 42 d post-IA).

3.1 OBJETIVOS

Los objetivos de este capítulo fueron:

- a. Evaluar la asociación entre la seroprevalencia a VDVB, IBR y *N. caninum* y la MET en vacas lecheras.
- b. Evaluar la asociación entre la seroconversión para VDVB, IBR y *N. caninum* y la MET en vacas lecheras.
- c. Identificar VDVB, IBR y *N. caninum* en los tejidos del *conceptus* muerto en vacas lecheras.
- d. Determinar la concentración de progesterona en sangre al momento del diagnóstico de MET.

3.2 HIPÓTESIS

Las hipótesis más relevantes de este capítulo fueron:

- a. La MET no se asocia con la seroprevalencia para VDVB, IBR y *N. caninum* en las vacas lecheras.
- b. La MET no se asocia con la seroconversión para VDVB, IBR y *N. caninum* en las vacas lecheras.

c. La MET no se asocia con el aislamiento de VDVB, IBR o *N. caninum* en los tejidos del *conceptus* muerto en vacas lecheras.

d. La concentración de progesterona en sangre es menor en vacas lecheras con MET con respecto a vacas que no tuvieron MET.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Selección y manejo de los animales

El estudio se realizó en un establecimiento lechero comercial, ubicado en Carlos Casares, Provincia de Buenos Aires, Argentina (35 ° 37 ' S, 61 ° 22 ' O) en el que se evaluaron vacas multíparas de raza Holstein (n= 92) entre marzo de 2017 y octubre de 2018. El manejo de los animales y del tambo es el mismo al descrito en el capítulo anterior.

3.3.2 Diseño experimental

Se realizó un estudio de cohortes prospectivo en el que se emplearon vacas lecheras (n= 92). El tamaño de la muestra se definió para obtener una diferencia del 15% entre grupos, con un nivel de confianza del 95% y un poder del 80%. Por tanto, se utilizaron dos grupos, vacas con MET (n= 46) y vacas No-MET (n= 46) (de Blas y col., 2006).

Se realizaron visitas cada 14 d para evaluar el estado reproductivo de las vacas. Se consideraron vacas con MET a aquellas en que a la US el embrión no presentaba latidos cardiacos o se evidenciaban membranas fetales desprendidas o estructuras flotantes en el período comprendido entre los 28 - 42 d post-IA (López-

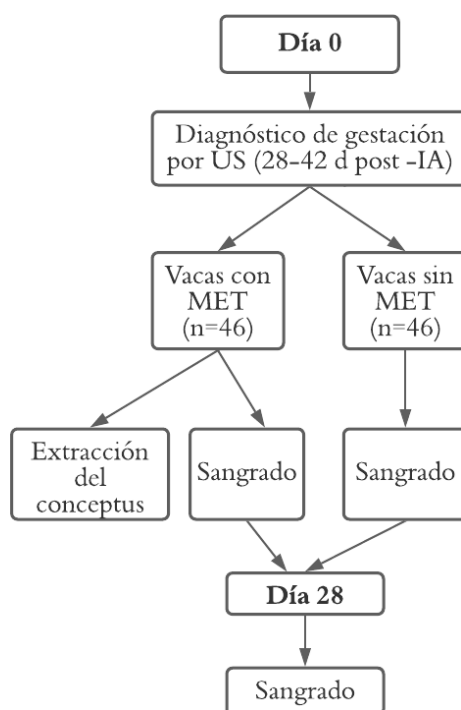
Gatius y García-Ispierto, 2010). Por otro lado, las vacas no-MET fueron definidas como vacas con diagnóstico de preñez positivo (28 - 42 d post-IA) con presencia de un embrión viable detectado por US.

3.3.3 Muestreo

El primer día del muestreo, considerado como día 0, es el momento en que se detectó mediante US y aspiró el *conceptus* de las vacas con MET (28 - 42 d post-IA). La toma de la muestra fue realizada con un catéter de plástico conectado a una pistola de IA recubierta por una funda sanitaria. Una vez fijado el cérvix por la vía rectal, se realizó una maniobra similar a la utilizada en la IA para llegar al cuerno uterino donde se produjo la MET (previamente detectada por US). La funda sanitaria fue perforada para exponer la punta del catéter plástico y la pistola de IA se desmontó del catéter de plástico y se retiró del útero. A continuación, se aspiraron los restos del *conceptus* muerto mediante el acople de una jeringa plástica de 60 ml. Finalmente, la muestra del *conceptus* fue fraccionada en dos partes, la primera fue colocada en un tubo de plástico libre de nucleasas de 1,5 ml y refrigerada a 4°C hasta su arribo al laboratorio (LAINPA, Laboratorio de Inmunoparasitología, FCV, UNLP) y la segunda fue colocada en un tubo de ensayo de vidrio de 10 ml con tapa que contenía medio esencial mínimo (MEM) y fue transportada a temperatura ambiente hasta su arribo al laboratorio (CEDIVE, Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias, FCV, UNLP). Además, en la misma visita (día 0) y cuatro semanas después (día 28), se obtuvieron muestras de sangre de todos los animales incluidos en el estudio (vacas con MET y vacas No-MET). Las muestras de sangre se mantuvieron a 4°C hasta ser centrifugadas.

Todas las muestras de suero fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior análisis. El esquema del muestreo se detalla en la figura 3.1.

Figura 3.1 Esquema del muestreo a campo en vacas lecheras con MET (n=46) y sin MET (n=46).



3.3.4 Análisis de laboratorio

3.3.4.1 Detección serológica de VDVB por Virus Neutralización (VN)

Se utilizó la prueba de VN utilizando células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) del Banco Argentino de Células (ABAC) libres del virus de VDVB y 100 dosis infecciosas de cultivo de tejidos al 50% (TCID₅₀) del prototipo VDVB tipo 1a adaptado al cultivo celular (Cepa Singer), según el manual de pruebas de

diagnóstico y vacunas para animales terrestres de la organización mundial de sanidad animal (OIE, 2018). El recíproco de la dilución sérica más alta capaz de neutralizar la replicación viral se consideró como el título neutralizante. La dilución de las muestras se realizó en base 2 comenzando con un título neutralizante de 1:2 hasta un título neutralizante final de 1:2048. La concentración de los anticuerpos neutralizantes se determinó mediante un examen microscópico directo de la placa en busca de evidencia de efecto citopático (EC) en las células MDBK5. Finalmente, se consideró la seroconversión cuando se registraron cambios en tres títulos neutralizantes entre el primer o el segundo muestreo (con 28 d de diferencia) (Alvarado y col. 2009).

3.3.4.2 Detección serológica de VDVB por ELISA

Se realizó la prueba de ELISA utilizando el kit ELISA PrioCHECK® VDVB Ab (Prionics®, Países Bajos) para detectar anticuerpos contra diferentes subtipos de VDVB (Ia, Ib y II) en suero, según las instrucciones del fabricante. Esta prueba utiliza dos anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes epitopes localizados en la proteína (P80) no estructural NS-3 altamente conservada del VDVB. En cada pocillo de esta placa se incubaron todos los sueros junto con la solución de antígeno de VDVB durante 60 minutos (en este paso compiten los anticuerpos monoclonales con los posibles anticuerpos presentes en las muestras problema que se unirían al antígeno). Posteriormente, se lavó e incubó con el monoclonal conjugado por 60 minutos. Se agregó sustrato cromógeno a cada pocillo y después de un periodo de incubación de 15 min a 22°C se determinó la presencia o ausencia de anticuerpos de VDVB mediante el desarrollo de color

medido ópticamente a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados se expresan a través de la interpretación de la inhibición porcentual, donde un resultado <50% es considerado negativo y un valor >50% positivo. Esta prueba no permite clasificar los anticuerpos frente a diferentes subtipos de VDVB, pero si diferencia entre animales vacunados con vacunas inactivas (cuyos anticuerpos no serán detectados) y no vacunados (anticuerpos producidos por una infección activa).

Esta prueba fue complementaria a la VN, y por tanto sus resultados no fueron incluidos en la determinación de la seroprevalencia ni en el modelo estadístico, pero si fueron descriptos en el anexo 3.1.

3.3.4.3 Determinación del efecto citopático de VDVB

Se inocularon 20 µl del *conceptus* de vacas con MET (n= 46) homogeneizado en células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) del Banco Argentino de Células (ABAC). Las células fueron cultivadas en placas de tejidos de 12 pocillos en medio mínimo esencial (MEM) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 100UI/ml de penicilina, 100 microgramos/ml de estreptomina y 100 microgramos/ml de ciprofloxacina (las células MDBK y el SFB fueron previamente probados para que estuviesen libres de VDVB. Las células de cultivo se incubaron a 37°C en 5% de dióxido de carbono (CO₂) con la finalidad de observar la presencia de cualquier efecto citopático (EC). Luego, se siguieron los cultivos durante tres pasajes ciegos (cada uno con 96 horas de incubación). Posterior a esto, y para confirmación de los diagnósticos, el VDVB fue evaluado por PCR en tiempo real.

3.3.4.4 Detección de VDVB por RT-qPCR

El ARN del *conceptus* de las vacas con MET (n= 46) fue extraído mediante el uso de un kit comercial (High Pure viral RNA kit; Roche) siguiendo las instrucciones de uso del fabricante. Se usaron cepas del VDVB tipo 1 (Cepa Singer) diluidas en SFB negativo para pestivirus hasta un título final de 10² dosis infecciosas de cultivo (TCID) por ml como control positivo y SFB libre de anticuerpos pestivirales (Abs) como control negativo (Pecora y col., 2020). Las transcripciones reversas (RT) se llevaron a cabo en un volumen de reacción final de 25 µl utilizando 500 ng de ARN. La mezcla de reacción consistió en 0,5 µg de primers random hexanucleoide (Biodynamics), 200 U de MMLV (Moloney murine leukemia virus; Promega), 20 U de inhibidor de la ribonucleasa ARNsin (Promega), 5X RT buffer (Promega) y 25mM de dNTPs mix (PBL). La reacción térmica fue a 42 °C durante 60 min, luego se aumentó la temperatura hasta 95 °C durante 5 min para inactivar la enzima. Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando una mezcla preformada y optimizada conteniendo SYBR Green (Fast-essential Green master mix, Roche) de acuerdo con las recomendaciones de uso del fabricante. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 12 µl y se utilizó ROX (5-carboxi-X-rodamina; Invitrogen) como colorante de referencia. Se utilizaron los cebadores específicos conocidos como "189-389" en una concentración final de 470 nM. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: paso de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos de 95 °C durante 20 s, 60 °C durante 20 s y 72 °C durante 20 s (Ciclador StepOne, Thermo Fisher Scientific). Se utilizó el análisis de la curva de melting para evaluar

los resultados; la especificidad de la amplificación se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (Pecora y col., 2020).

3.3.4.5 Detección serológica de IBR por VN

Se utilizó la prueba de VN utilizando células Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) del Banco de células argentinas (ABAC) para detectar anticuerpos contra la cepa BoHV-1 cepa los Ángeles (LA). Las diluciones fueron en serie de 1/2 a 1/512 y se incubaron con 100 dosis infecciosas de 50% de cultivo de tejidos (DICT50), con un rango de variación de 30-300 DICT50 para BoHV-1. Finalmente, la lectura se realizó a las 72 horas (Alvarado y col., 2009).

3.3.4.6 Determinación del efecto citopático de IBR

Se inocularon 20 µl del *conceptus* de las vacas con MET (n=46) homogeneizado en células Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) del Banco Argentino de Células (ABAC). Las células fueron cultivadas en placas de tejidos de 12 pocillos en medio mínimo esencial (MEM) suplementado al 10% con suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, 100UI/ml de penicilina, 100 microgramos/ml de estreptomina y 100 microgramos/ml de ciprofloxacina (las células MDBK y el SFB fueron previamente probados para que estuviesen libres de BoHV-1. Las células de cultivo se incubaron a 37°C en 5% de dióxido de carbono (CO₂) con la finalidad de observar la presencia de cualquier efecto citopático (EC). Luego, se siguieron los cultivos durante tres pasajes ciegos (cada uno con 96 horas

de incubación). Posterior a esto, y para confirmación de IBR se realizó la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada por Bucles (LAMP).

3.3.4.7 Detección de IBR por LAMP

El ADN fue extraído del *conceptus* de las vacas con MET (n= 46), luego, el sobrenadante de los cultivos celulares (descrito en la sección anterior) fue extraído con lisis térmica (Soliman y El-Matbouli, 2005; Shan y col., 2014). La presencia de ADN de BoHV-1 se analizó mediante la técnica de LAMP de acuerdo con (El-kholy y col., 2014). La reacción se realizó en un volumen de 25 μ L que contiene: WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix, (New England Biolabs, Massachusetts, EE. UU), 50 pmoles de Ge-FIP y Ge-BIP, 5 pmoles de Ge-F3, Ge-B3, y 2 μ L de plantilla de ADN, finalmente se agregó agua para PCR hasta completar 25 μ L. El ADN extraído de la cepa LA se usó como control positivo, y el sobrenadante de un cultivo celular libre del virus se usó como control negativo. La incubación se realizó a 56° C durante 60 min. Los productos LAMP se visualizaron para el cambio de color y se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% buscando los patrones en forma de escalera bajo luz UV.

3.3.4.8 Detección serológica de *N. caninum* por Inmunofluorescencia Indirecta

Los sueros fueron analizados mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos de *N. caninum*. Se utilizó un título de corte de 1:200 y se procesaron hasta el título final (Campero y col., 2018). Se usó la cepa NC-1 como antígeno y se añadieron sueros diluidos en PBS a los portaobjetos. Luego, se realizó una incubación de 30 minutos a 37°C. Los portaobjetos se enjuagaron suavemente con tampón de carbonato (pH 9) y se lavaron durante 10 minutos. Además, se usó e incubó un conjugado de anticuerpo de IgG anti-bovino de conejo purificado por afinidad marcado con fluoresceína isotiocianato (FITC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE. UU.). Como se mencionó anteriormente, se repitió el lavado y se observaron los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). La fluorescencia ininterrumpida de la membrana de taquizoitos se consideró una reacción positiva. Figura 3.2. Finalmente, la seroconversión fue definida cuando se detectó una diferencia en ≥ 3 títulos entre el primer y segundo muestreo (diferencia de 28 d) (Moré y col., 2009).

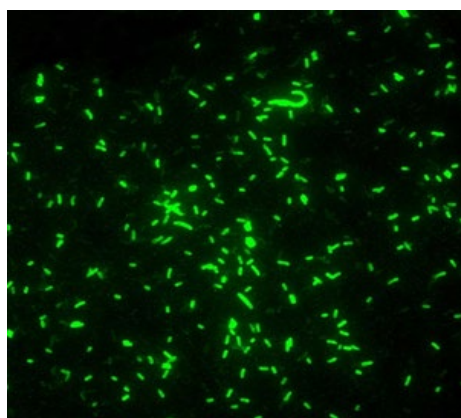


Figura 3.2 Microfotografía de taquizoitos de *N. caninum* mediante IFI.

3.3.4.9 Detección de *N. caninum* por PCR

El ADN del *conceptus* de las vacas con MET seropositivas al día 0 (n=11) fue extraído con un kit comercial (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó una PCR convencional utilizando el par de cebadores Np6 + / Np21 +, amplificando un fragmento de 328 pb (Müller y col., 1996). Se usó ADN de la cepa *N. caninum* NC-1 como control positivo y ADN de células VERO como control negativo. Los resultados de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con SYBR safe (Invitrogen, USA) y se compararon con un marcador de peso molecular estándar de escalera de 100 pb (Campero y col., 2015).

Los métodos diagnósticos descritos anteriormente se resumen en la Figura 3.3.

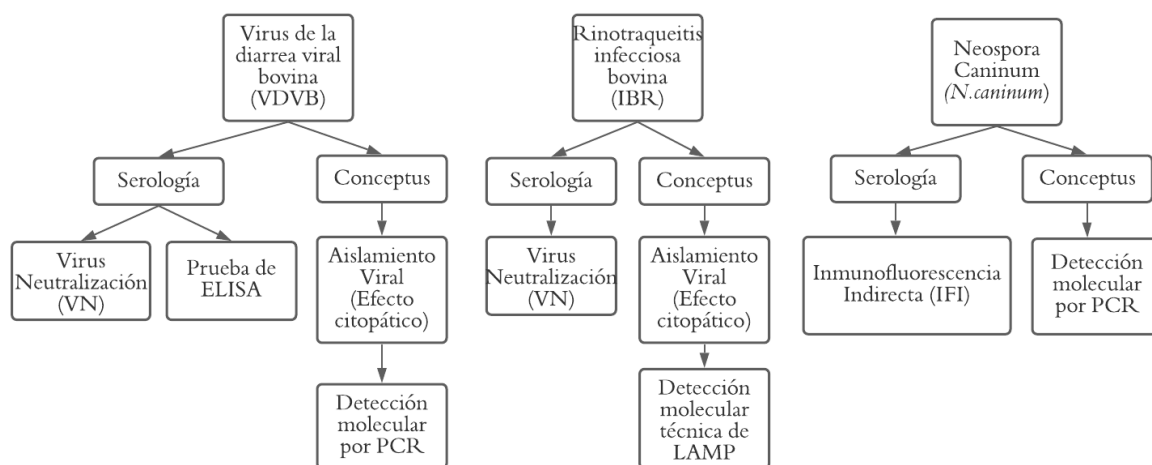


Figura 3.3. Métodos diagnósticos utilizados en la detección de VDVB, IBR y *N. caninum* en vacas lecheras con MET (n=46) y sin MET (n= 46).

Los *conceptus* solamente fueron analizados en vacas con MET (n= 46).

Los sueros fueron analizados en vacas con MET (n= 46) y sin MET (n= 46).

3.3.4.10 Análisis de progesterona

La concentración P4 en plasma se midió por quimioluminiscencia (Immunoanalyzer Elecsys y Cobas e, Roche®, Mannheim, Alemania). La precisión del ensayo se determinó mediante la inclusión de dos muestras control con concentraciones de P4 bajas (0,82 ng / ml) y altas (7,46 ng / ml) al inicio y al final del ensayo. Los coeficientes de variación intra-ensayo fueron del 3% para el control de P4 bajo y del 14% para las muestras de control de P4 alto.

3.3.5 Análisis estadístico

En este estudio se consideró a la vaca como la unidad experimental. Los datos descriptivos se obtuvieron con Procedimiento Freq de SAS (SAS / STAT ver. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC). Además, la asociación entre la MET y la concentración de P4 en sangre se evaluó mediante un modelo de regresión lineal con el Procedimiento Glimmix de SAS, para el que se empleó una distribución normal y una función de enlace identidad. Además, se utilizaron modelos de regresión logística para evaluar la asociación entre títulos serológicos para VDVB, IBR (detectados por VN) y *N. caninum* (detectados por IFI) (como predictores continuos) y el riesgo de MET (modelo 1); para evaluar la seroconversión (sí vs. no) a VDVB, IBR y *N. caninum* con el riesgo de MET (modelo 2), y para determinar la asociación entre la concentración de P4 en sangre con el riesgo de MET (modelo 3). Los modelos logísticos se ejecutaron con el Procedimiento Glimmix de SAS, con una distribución binomial y una función de enlace logit. El modelo 3 incluyó la P4 como predictor continuo y evaluó la chance de MET por cada aumento de 1 DE (3,98 ng / ml) sobre la concentración media de P4 (6,87 ng / ml).

3.4 RESULTADOS

En el primer día de muestreo (día 0), las seroprevalencias para VDVB e IBR fueron del 100% (46/46) en vacas con MET y No-MET, mientras que la seroprevalencia para *N. caninum* fue del 23,9% (11/46) en vacas con MET y del 17,3% (8/46) en vacas no-MET. En el segundo día de muestreo (día 28), la seroprevalencia para VDVB también fue del 100% (46/46) en vacas MET y No-MET; mientras que la seroprevalencia para IBR fue del 93,4% (43/46) en vacas con MET y del 82,6% (38/46) en las No-MET. Finalmente, la seroprevalencia para *N. caninum* fue del 21,7% (10/46) en las MET y del 15,2% (7/46) en las No-MET (Anexos 3.1 y 3.2).

La seroconversión para VDVB fue del 20,0% en vacas con MET (9/46) y del 6,6% (3/46) en vacas no-MET, mientras que para IBR fue 4,4% (2/46) en las MET y del 2,2% (1/46) en las No-MET. Finalmente, la seroconversión para *N. caninum* fue del 4,4% (2/46) en las vacas con MET y del 6,6% (3/46) en las No-MET. Con respecto al *conceptus*, solo se detectó el VDVB en vacas que seroconvirtieron (n=9). Por el contrario, no se identificó IBR (n=46) ni *N. caninum* (n=11) en los *conceptus* de las vacas con MET. La concentración de P4 en sangre fue de $6,62 \pm 0,59$ ng /mL en vacas con MET y de $7,13 \pm 0,60$ ng /mL en vacas No-MET (P = 0,545).

3.4.1 Riesgo de MET

El riesgo de padecer MET se asoció con la seroprevalencia de VDVB al segundo muestreo (VDVB-2, P = 0,03, Tabla 3.1), dado que la chance de MET aumentó 3,44 veces por el incremento de 1 DE en el título sobre la media.

Contrariamente, el riesgo de MET no se asoció con el resto de las seroprevalencias en ninguno de los dos muestreos (VDVB-1, IBR-1, *N. caninum*-1, IBR-2 y *N. caninum*-2, Tabla 3.1). Por otra parte, el riesgo de MET también tuvo una tendencia a asociarse con la seroconversión a VDVB ($P = 0,09$, Tabla 3.2) dado que la chance fue 3,27 veces mayor en las vacas que seroconvirtieron con respecto a las demás. Contrariamente, la seroconversión a IBR y *N. caninum* no se asoció con el riesgo de MET (Tabla 3.2). Finalmente, el riesgo de MET no se relacionó con la concentración de P4 en sangre, debido a que el incremento de 1 DE ($DE = 3,98 \text{ ng / mL}$) sobre la media (media = $6,87 \text{ ng / mL}$) tuvo un RP de 0,878 (IC 95% = $0,577 - 1,338$, $P = 0,542$).

Tabla 3.1. Modelo logístico univariable que evalúa la asociación de títulos séricos para VDVB, IBR y *N. caninum* con las chances de muerte embrionaria tardía (MET) en vacas lecheras con MET (n= 92).

	RP ¹	IC 95% ²	P
VDVB-1 ³	1,332	0,830 – 2,138	0,232
IBR-1 ⁴	1,281	0,796 – 2.062	0,304
<i>N. caninum</i> -1 ⁵	1,211	0,780 – 1,882	0,389
VDVB-2 ⁶	3,439	1,116 – 10,600	0,032
IBR-2 ⁷	1,123	0,707 – 1,783	0,619
<i>N. caninum</i> -2 ⁸	1,335	0,744 – 2,395	0,329

MET: muerte embrionaria tardía definida como la ausencia de latidos cardíacos del embrión o la evidencia de membranas fetales desprendidas o de estructuras flotantes detectadas mediante ultrasonografía transrectal 28 - 42 d post-IA (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010).

¹RP: Chance para MET expresado como el incremento de 1 DE sobre la media del título (los títulos fueron considerados como predictores continuos);

²IC: Intervalo de confianza del 95%;

³VDVB -1: título sérico para diarrea viral bovina (día 0);

⁴IBR-1: título sérico para rinotraqueitis infecciosa bovina (día 0);

⁵*N. caninum*-1: título sérico para *Neospora caninum* (día 0);

⁶VDVB -2: título sérico para diarrea viral bovina al segundo muestreo (día 28);

⁷IBR-2: título sérico para rinotraqueitis infecciosa bovina al segundo muestreo (día 28);

⁸*N. caninum*-2: título sérico para *Neospora caninum* al segundo muestreo (día 28).

Tabla 3.2. Modelo logístico univariable que evalúa la asociación de la seroconversión a VDVB, IBR y *N. caninum* con las chances de muerte embrionaria tardía (MET) en vacas lecheras (n= 92).

		% ¹	RP ²	95%IC ³	P
VDVB ⁴	No	47,9	1		0,098
	Si	75,0	3,265	0,799-13,347	
IBR ⁵	No	51,3	1		0,607
	Si	66,7	1,902	0,169 – 22,653	
<i>N. caninum</i> ⁶	No	50,6	1		0,649
	Si	40,0	0,652	0,101 – 4,197	

MET: muerte embrionaria tardía definida como la ausencia de latidos cardíacos del embrión o la evidencia de membranas fetales desprendidas o de estructuras flotantes detectadas mediante ultrasonografía transrectal 28 - 42 d post-IA (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010).

¹ %: Media mínima de cuadrados estimados (expresada en %);

² RP: Chance para MET;

³ IC Intervalo de confianza del 95%;

⁴ VDVB: seroconversión para el virus de la diarrea viral bovina (la seroconversión fue definida como el aumento de 3 veces el título al día 28);

⁵ IBR: seroconversión para rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) (la seroconversión fue definida como el aumento de 3 veces el título al día 28);

⁶ *N. caninum*: seroconversión para *Neospora caninum* (la seroconversión fue definida como el aumento de 3 veces el título al día 28).

3.5 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos muestran que tanto la seroprevalencia para VDVB-2 como la seroconversión para VDVB se asocian con la chance de padecer MET. Sin embargo, contradicen parcialmente las hipótesis de trabajo propuestas en las que planteamos que la seroprevalencia y la seroconversión para VDVB, IBR y *N. caninum* no son factores de riesgo de MET en las vacas lecheras. A su vez, también se detectó el virus de la VDVB en el *conceptus* de vacas que seroconvirtieron. Estos hallazgos coinciden con lo reportado por Gard y col. (2010) quienes informaron que vaquillonas detectadas con VDVB tuvieron 60% de muerte fetal (67 d post-IA). Así mismo, Rufenach y col. (2001) indicaron que la seroconversión para VDVB es fundamental para determinar el tiempo estimado de exposición al virus y, a su vez, informaron una tasa de abortos del 15,8%.

Contrariamente, Aragaw y col. (2018) no encontraron ninguna asociación entre VDVB y pérdida de gestación.

Con relación a la asociación entre VDVB y MET, Gard y col. (2010) reportaron que la inoculación de un medio de cultivo para transferencia embrionaria con la cepa NCP de VDVB genera muerte fetal 67 d post-transferencia. Además, Fray y col. (2000) informaron que la presencia de VDVB en las vaquillonas persistentemente infectadas reduce la calidad de sus ovocitos.

En este sentido, Grooms y col. (1998) detectaron VDVB en ovarios 60 d después de un cuadro de infección aguda, por lo que, podría esperarse que el VDVB esté presente, tanto a nivel ovárico como uterino, previo a que ocurra la MET. Además, Fair (2015) informó que durante la gestación aumentan los linfocitos T

supresores, que inducen una inmunosupresión inespecífica de linfocitos T y B, lo que facilitaría la llegada del VDVB al *conceptus*.

Otra posible explicación sería que el VDVB inhibe la producción de interferones, lo que disminuye la capacidad de respuesta inmune en las vacas y facilita la presentación de MET. En este sentido, algunos estudios indicaron que la infección experimental con la cepa NCP de VDVB inhibe la regulación de genes estimulados por interferón, que son los encargados de controlar la inmunidad uterina, la remodelación del estroma, la hiperplasia de las glándulas endometriales y el desarrollo de la vasculatura sanguínea uterina (Cheng y col., 2017; Oguejiofor y col., 2015). Es decir, como los genes estimulados por el interferón regulan el ambiente endometrial (Cheng y col., 2016), podrían actuar como un factor de riesgo de la MET. En este sentido, Cheng y col. (2016a) indicaron que la infección NCP de VDVB cambia la producción de prostaglandinas endometriales de PGF2 alfa a PGE2. Es decir, la PGF2 alfa se reconoce como un potenciador inmunológico, mientras que la PGE2 actúa como un inmunosupresor y luteotrófico (Herath y col., 2009).

Con respecto a IBR, Waldner y Kennedy (2008) encontraron una asociación significativa entre las pérdidas de gestación y la presencia de IBR en vacas lecheras. Sibhat y col. (2018) en Etiopía informaron una relación significativa entre las pérdidas fetales (280 d post-IA) y la presencia de IBR detectada por serología en vacas lecheras. Las discrepancias entre nuestro estudio y estos otros podrían deberse a las ventanas de tiempo evaluadas (muerte fetal vs. MET). Además, como el IBR es endémico en nuestro medio, podría cursar de manera asintomática en nuestros animales. En este sentido, Benavides y col. (2020) indicaron que el IBR

solo se manifiesta en bovinos en situaciones de mucho estrés (p. ej.: movimiento de animales, cambios en la rutina de manejo y alteraciones del bienestar animal).

Finalmente, no se encontró una asociación del riesgo de MET y *N. caninum*. Esto último concuerda con lo informado por López-Gatius y col. (2004a) quienes tampoco encontraron esta asociación 34 - 90 d post-IA en vacas lecheras. Sin embargo, Pessoa y col. (2016) indicaron que *N. caninum* se relaciona con pérdidas fetales (280 d post-IA) en las vacas lecheras. Una razón de estas diferencias podría deberse a las rutas de infección de *N. caninum*. En este sentido, Dubey y col. (2007) indicaron que la ruta vertical (transplacentaria) de infección debe ir acompañada de la transmisión horizontal (ciclo del protozoario) porque sin ella los niveles de infección de *N. caninum* tenderían a disminuir a lo largo del tiempo (French y col., 1999). Una de las hipótesis propuestas relacionadas con estas diferencias es que los perros (hospedador definitivo) tengan un acceso fácil a las placentas y a los fetos abortados, lo que favorecería la transmisión horizontal de *N. caninum* (Dubey y Schares, 2011). No obstante, creemos que esta ruta de infección no es importante en el establecimiento donde se realizó este estudio debido a que no utilizan perros como mascotas ni en las rutinas de trabajo, lo que minimizaría el riesgo de contagio con este agente solamente a la ruta de transmisión vertical.

Con respecto a la P4 en sangre, los resultados obtenidos de que vacas con y sin MET tienen concentraciones similares ($P= 0,545$) contradice la hipótesis planteada acerca de que las vacas con MET tienen menores concentraciones de P4 que sus compañeras. Este hallazgo coincide con lo informado por Pohler y col. (2016) quienes tampoco encontraron una relación entre la P4 en sangre y el riesgo de MET (24-31 d post-IA). Por el contrario, Ahmad y col. (2018) registraron que

vacas con MET (24-42 post-IA) tuvieron niveles de P4 en sangre inferiores a las vacas que no tuvieron MET. Por tanto, como los niveles de P4 en sangre son similares en vacas MET y No-MET (28-42 d post-IA), podríamos proponer que la luteólisis no explicaría la presentación de MET.

De hecho, como la MET se relaciona con el virus de la VDVB podríamos teorizar que la MET estaría asociada con la activación del sistema inmune (es decir, respuesta inflamatoria). Esta teoría concuerda con las observaciones de campo realizadas por veterinarios de la actividad privada, quienes informan una alta proporción de muertes embrionarias tras la vacunación contra la fiebre aftosa (con virus inactivado) en establecimientos tanto de producción de leche como de carne después de realizar una inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). En este sentido, Ferreira y col. (2016) al igual que Marqués y col. (2019) informaron que el riesgo de pérdida temprana de la preñez aumenta respectivamente 4 y 2,8 veces cuando la vacunación tiene lugar 31 y 33 d post-IA.

Es importante afirmar, que este es el primer estudio que relaciona la seroprevalencia, la seroconversión para VDVB, IBR y *N. caninum* con el riesgo de MET, y la detección molecular de VDVB, IBR y de *N. caninum* en el *conceptus* de las vacas con MET. Además, se informa la concentración de P4 en sangre al momento de la MET. Vale la pena resaltar, que tanto la detección de MET por US como la aspiración del *conceptus* se realizó en el mismo momento del diagnóstico de preñez (es decir, cuando el embrión estaba muriendo o había muerto recientemente). Esto último nos permitió recolectar la muestra y enviarla directamente al laboratorio en un tiempo realmente breve, mientras que la mayoría de los estudios publicados hasta el momento han detectado el virus de la VDVB, el

de la IBR y *N. caninum post-mortem* en fetos abortados, lo que dificulta el diagnóstico debido a que las muestras tienen autólisis puesto que son recolectadas varias horas después de producido el aborto.

3.6 CONCLUSIONES

Se concluye que el VDVB es un factor de riesgo de la MET en las vacas lecheras, debido a que la seroprevalencia y la seroconversión incrementan la chance de las vacas lecheras de padecer MET. Por el contrario, el virus de la IBR y *N. caninum* no son factores de riesgo de MET y no hay diferencias en la concentración de P4 en vacas con y sin MET. Por tanto, podría postularse que la causa de MET podría asociarse con la activación de una respuesta inmune (p.ej.: a consecuencia del VDVB).

CAPÍTULO 4: SALUD UTERINA Y EFICIENCIA REPRODUCTIVA POST MUERTE EMBRIONARIA TARDÍA

4. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 2 de este trabajo de tesis se observó que la MET es una de las causas principales de ineficiencia reproductiva en vacas lecheras debido a que alarga el intervalo parto - parto en 108 días (Quintero Rodriguez y col., 2019). En este sentido, varios estudios han demostrado que el SF a la primera IA varía entre el 26,7 y el 50,7% (Siddiqui y col., 2013; Tillard y col., 2008), y que su alteración es la principal causa del aumento de días abiertos y de refugos por infertilidad en los rodeos lecheros (Chang y col., 2006). Por tanto, identificar las causas que potencialmente limiten el éxito; es decir, la obtención de un SF después de la MET sería muy útil para conocer la futura fertilidad en las vacas lecheras. En este sentido, Walsh y col. (2011) indicaron que es necesario que el útero de las vacas se encuentre en óptimas condiciones para lograr un desarrollo embrionario normal. Está demostrado que la ES disminuye la tasa de concepción al primer servicio y aumenta el intervalo parto-concepción en 30 días (Madoz y col., 2013) y que el fluido en la luz uterina detectado por US se relaciona con una menor fertilidad en vacas repetidoras (Jaureguiberry y col., 2016). Sin embargo, esta información es desconocida en vacas lecheras que padecen MET. Por otro lado, está demostrado que la ciclicidad ovárica evaluada por US es fundamental para lograr un SF de manera oportuna (Bartolome y col. 2005). También, la tasa de concepción a la primera IA en un estro detectado es más alta que la lograda en vacas sometidas a un programa de IATF con un protocolo Ovsynch (Jobst y col., 2000; Tenhagen y

col., 2004). De manera que, la actividad ovárica desempeña un rol fundamental en el éxito reproductivo en los rodeos lecheros.

Si bien, todos los trabajos expuestos anteriormente indican que la inactividad ovárica, la MET y la presencia de procesos inflamatorios en el útero alteran la eficiencia reproductiva en vacas lecheras, todavía se desconoce completamente qué ocurre con la salud uterina y con la actividad ovárica de las vacas que padecen MET y, por tanto, no se sabe cómo es la fertilidad futura de esas vacas en su lactancia.

4.1 OBJETIVOS

Los objetivos de este capítulo fueron:

- a. Evaluar el estado clínico del tracto reproductivo (útero y ovarios) en vacas lecheras que padecieron MET.
- b. Evaluar la fertilidad post-MET de las vacas lecheras dentro de la misma lactancia.

4.2 HIPÓTESIS

Las hipótesis más relevantes de este capítulo fueron:

- a. El estado de salud del tracto reproductivo (útero y ovarios) en las vacas lecheras que han padecido una MET no se encuentra comprometido.
- b. La fertilidad de las vacas que padecen una MET no queda comprometida dentro de la misma lactancia.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se realizaron dos estudios en un establecimiento comercial ubicado en Carlos Casares, provincia de Buenos Aires, Argentina ($35^{\circ} 37' S$, $61^{\circ} 22' W$) descrito previamente (para más detalles ver los dos capítulos anteriores).

4.3.1 ESTUDIO 1

4.3.1.1 Diseño experimental

Se realizó un estudio observacional retrospectivo en el que se emplearon los registros productivos y reproductivos de 642 vacas que fueron diagnosticadas con MET por US (28 - 42 d post-IA) entre el 1 de enero de 2011 y el 31 de diciembre de 2015. La recolección y la extracción de los datos se realizó con el software comercial DIRSA (Dirsa S.A., Gonnet, Argentina).

4.3.1.2 Criterios de selección y muestreo

Se utilizó la definición de MET descrita anteriormente. Se estimó el intervalo de tiempo (en días) entre el parto y el SF en las vacas que registraban una MET en esa gestación, y se lo denominó PRE-MET. Además, para esas mismas vacas se determinó el intervalo de tiempo entre la MET y el siguiente SF, y se lo llamó POS-MET.

Criterios de inclusión: Se consideraron válidos los registros productivos y reproductivos que tenían: 1- un diagnóstico de MET por US entre los 28 - 42 días post-IA.; 2- registro de las fechas de parto, de la primera IA y del SF después del

parto y de la MET; 3) al menos un dato de producción de leche 14 ± 3 d previo al SF. Las vacas que tuvieron más de un evento de MET dentro de la misma lactancia o que no cumplieron con alguno de los criterios de inclusión fueron excluidas del estudio ($n=42$). El período de espera voluntario empleado fue de 50 d, mientras que el período de espera entre la MET y el alta reproductiva fue de 14 ± 3 d.

4.3.1.3 Análisis estadístico

La asociación entre la MET y la tasa de riesgo instantánea de preñez (TRI) se evaluó con un modelo de Riesgos Proporcionales de Cox mediante el Procedimiento PHReg de SAS. Los períodos de riesgo (de padecer el evento preñez) considerados fueron el intervalo de tiempo entre el final del período de espera voluntario (50 DEL) y el final del estudio (300 d post- espera voluntaria) para el grupo PRE-MET, y el intervalo de tiempo entre el alta reproductiva post-MET (14 d post-MET) y el final del estudio (300 d post-MET) para el grupo POS-MET. El modelo también incluyó los efectos fijos del número de partos (1 vs. 2 vs. ≥ 3) y de la producción de leche diaria previa al SF (como predictor continuo). Por otra parte, para mejorar el ajuste del modelo se incluyó el efecto de los DEL al SF. Por último, se utilizó un modelo de supervivencia de Kaplan-Meier mediante el Procedimiento LIFETEST de SAS para estimar el intervalo de tiempo a la preñez.

4.4 RESULTADOS

Se excluyeron 125 animales del grupo POS-MET (censura a la izquierda) debido a que fueron refugados por las siguientes causas: (cojera = 44, tuberculosis = 13, mastitis = 57 y muerte = 11). La MET se asoció con el riesgo instantáneo de

preñez, debido a que las vacas POS-MET tuvieron una tasa de riesgo instantáneo de preñez mayor que las vacas PRE-MET (TRI = 1,267, IC del 95% = 1,045 – 1,537, P <0,01). Además, las vacas POS-MET tardaron 15 d menos en quedar preñadas que las PRE-MET (mediana [IC 95%], 9 [9 – 10] vs. (24 [23 – 26] d., P <0,01, Figura 4.1).

Por otra parte, la TRI de preñez no se asoció con el número de partos (P = 0,91, TRI = 1,035 [IC del 95% = 0,855 – 1,252] y TRI = 1,034 [IC del 95% = 0,872 – 1,226] para vacas de 2 y ≥ 3 partos, respectivamente). La TRI de preñez tampoco se asoció con la producción de leche (TRI = 1,013 [IC 95% = 0,971 – 1,057], P = 0,6). Por último, la TRI de preñez se relacionó con los DEL-SF, debido a que la tasa de riesgo instantáneo de preñez disminuyó cada 21 días por encima de la media (TRI = 0,815 [IC 95% = 0,770 – 0,864], P <0,01).

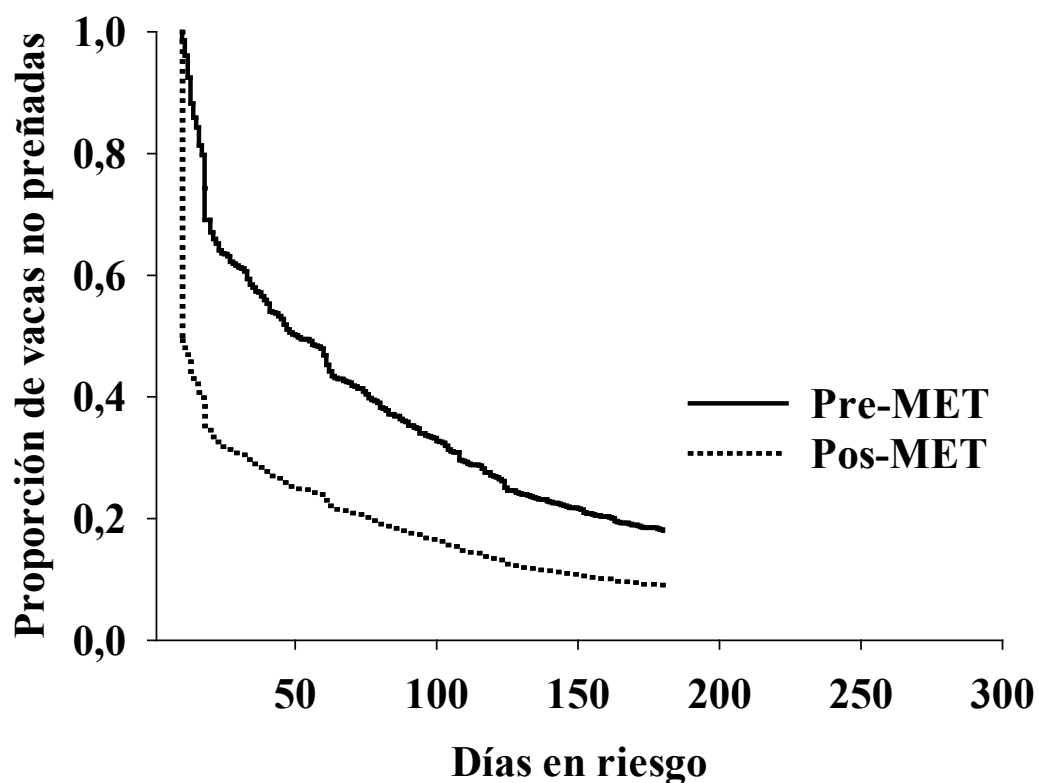


Figura 4.1. Intervalo de tiempo hasta la preñez en vacas lecheras antes de la MET (PRE-MET, n= 642) y después de padecer un evento de muerte embrionaria tardía (POS-MET, n= 517).

En el grupo POS-MET se censuraron a la izquierda 125 animales (cojera = 44, tuberculosis = 13, mastitis = 57 y muerte = 11) y a la derecha otras 171 vacas que no registraron SF. La muerte embrionaria tardía (MET) se definió como la ausencia de latidos cardíacos del embrión o la evidencia de membranas fetales desprendidas o de estructuras flotantes detectadas mediante ultrasonografía transrectal 28 - 42 d post-IA (López-Gatius y García-Ispuerto, 2010).

4.3.2 ESTUDIO 2

4.3.2.1 Diseño experimental

Se realizó un estudio observacional transversal en el que se emplearon vacas multíparas de raza Holstein. El número de vacas lecheras con MET a evaluar se estimó con una prevalencia esperada del 25%, un nivel de confianza del 95% y un poder del 80% (n=46) (de Blas y col., 2006).

4.3.2.2 Criterios de selección y muestreo

Entre marzo de 2017 y octubre de 2018 se realizaron visitas al mismo establecimiento descrito anteriormente y se evaluaron las vacas seleccionadas a los 14 ± 3 d después del diagnóstico de MET. En cada visita se evaluó el flujo vaginal obtenido con Metricheck, se muestreó el útero con la técnica del Cytobrush y, además, se detectó la presencia de estructuras ováricas y de fluido en la luz uterina mediante US.

4.3.2.3 Diagnóstico de endometritis clínica y de ES

Se consideró que las vacas padecían endometritis clínica cuando contenían pus en el flujo vaginal a partir de los 21 DEL (Sheldon y col., 2006). A las vacas con flujo cero (n= 46) se les efectuó el diagnóstico de ES, se realizó un cepillado endometrial por medio de la técnica de Cytobrush (CB). Para esto se utilizó una pistola de acero inoxidable que consta de dos partes, una pieza tubular externa y un vástago interno que posee 1 cm de rosca en su extremo anterior. Al extremo

anterior se le adosó un cepillo estéril utilizado en ginecología humana (Medibrush XL ®, Medical Engineering Co, SA). Además, se le colocó una vaina de IA (IVM Technologies, Francia) cubriendo la pistolaleta y el cepillo. Posteriormente, previa limpieza de la zona vulvar, la pistolaleta se introdujo vía vaginal para después atravesar los anillos cervicales por una maniobra similar a la de IA. Una vez pasado el cérvix, se expuso el cepillo al endometrio y con la mano que estaba ubicada en el recto se ejerció una leve presión para favorecer el contacto con la pared endometrial. Luego se rotó el cepillo unas 4 veces, se retrajo el cepillo para que quede protegido nuevamente por la vaina plástica de inseminación y, finalmente, se retiró la pistolaleta. Figura 4.2.

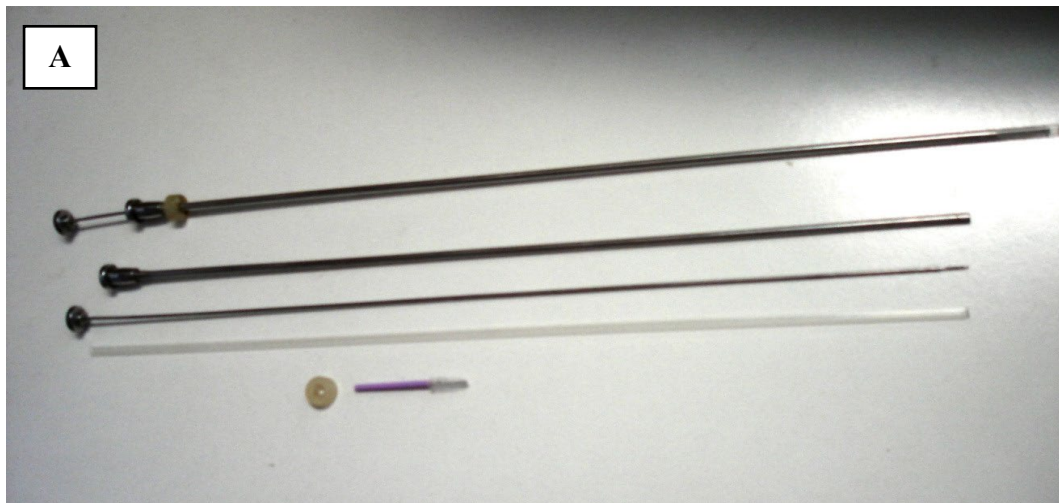


Figura 4.2 Fotografías del instrumental utilizado en el estudio para realizar el cepillado del endometrio. A) pistola armada y por debajo, las partes que la forman; B) porción anterior de la pistola, donde se observa el cepillo y la vaina que lo recubre.

Una vez tomada la muestra, se desmontó el cepillo de la pistola, se lo rotó sobre un portaobjetos nuevo, se rotuló y fijó para preservar la morfología celular. Se utilizó un fijador comercial de cabello en aerosol (Roby, Argentina) para rociar finamente el portaobjetos. Una vez en el laboratorio, las muestras se colorearon con tinción comercial diferencial rápida tipo Giemsa modificada, Tinción 15 (Biopur, Argentina). Figura 4.3.

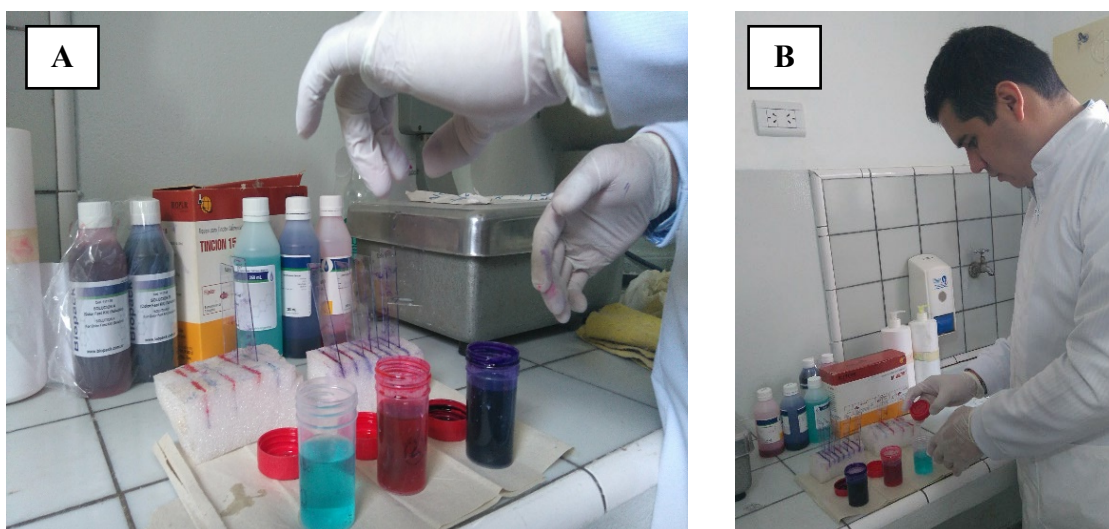
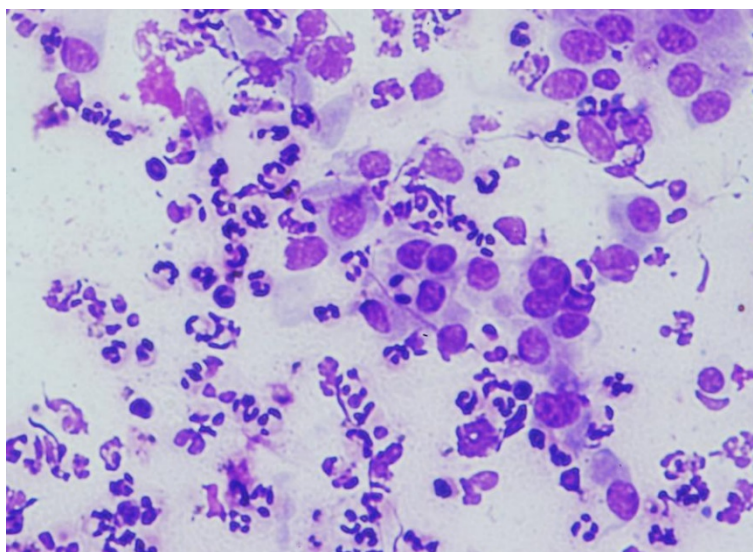


Figura 4.3 Fotografías del procesamiento de la muestra en el laboratorio. A coloración del extendido con tinción 15; B secado de las muestras.

El conteo celular se realizó con un microscopio óptico (Nikon Eclipse E200, Japón) con un aumento de 400 veces (40 X). Por último, se contaron 200 células en cada preparado y se obtuvo el porcentaje de PMN. Se utilizó un punto de corte del 5% de PMN para diagnosticar ES (Madoz y col. 2014). Figura 4.4

Figura 4.4 Microfotografía de un extendido de citología endometrial.



4.3.2.4 Evaluación de estructuras ováricas y de la presencia de fluido uterino

La evaluación se realizó vía US transrectal con un transductor lineal de 7,5 MHz (Esaote Tringa Linear Vet, Pie Medical). En esta evaluación se recorrió todo el útero y se midió el diámetro de la luz uterina (en milímetros) para detectar presencia de fluido luminal en la base de uno de los cuernos. Se consideró una luz uterina de ≥ 2 mm como indicativa de presencia de líquido en el útero (Jaureguiberry 2016). Además, se midió el tamaño folicular (en milímetros) y se registró la

presencia de CL en los dos ovarios. La actividad ovárica se definió como la presencia de CL en cualquiera de los dos ovarios o de folículos ≥ 10 milímetros.

4.3.2.5 Análisis estadístico

La proporción de vacas con endometritis clínica, con ES, con fluido uterino y con actividad ovárica a los 14 ± 3 días post-MET se estimó mediante análisis descriptivo de los datos con el Procedimiento Univariate de SAS.

4.5 RESULTADOS

El análisis descriptivo de las vacas que habían padecido una MET detectó que 14 ± 3 días más tarde, el 100% (46/46) tenían flujo vaginal normal (flujo sin rastros de pus), que el 21% (10/46) tenía ES, que el 17% (8/46) tenía fluido en el útero y, finalmente, que el 15% (7/46) padecen de anestro.

4.6 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de que las vacas POS-MET tardan 15 d menos en preñarse y que tienen una TRI de preñez mayor que las PRE-MET soporta la hipótesis planteada que propone que las vacas que padecen un evento de MET no quedan con su fertilidad comprometida en esa misma lactancia. Además, el hallazgo de que las vacas que sufren una MET a las dos semanas poseen el tracto reproductivo relativamente normal (21% de ES y 17% de fluido uterino) y buen nivel de actividad ovárica (85%) concuerda con la hipótesis planteada de que el estado de salud del tracto reproductivo (útero y ovarios) en las vacas lecheras que han padecido una MET no permanece comprometido. Una de las ventajas del

enfoque utilizado en este capítulo es que reduce la variación entre animales, debido a que evalúa la fertilidad de las mismas vacas antes y después de la MET dentro de la misma lactancia, pero como contrapartida los animales están en dos momentos diferentes de la lactancia. Es decir, las vacas PRE-MET producían $35,17 \pm 0,32$ kg leche / d al momento de recibir su SF, mientras que las vacas POS-MET producían $31,45 \pm 0,33$ kg leche / d al recibir su SF como mínimo dos meses más tarde. En el trabajo presentado en el capítulo 2, se comparan dos grupos de vacas diferentes, uno que padece MET y otro que no, y lo que se observa es que el intervalo parto - parto se prolonga a consecuencia de la MET (108 d, Quintero Rodriguez y col., 2019). Si bien en este capítulo no se evaluaron las posibles causas de la MET, los datos obtenidos nos muestran que las vacas vuelven a preñarse rápidamente después del evento de MET.

El hallazgo de la asociación entre los DEL-SF y la tasa de riesgo de preñez coincide con lo reportado por Kim y Jeong (2019) y por Rearte y col. (2018) quienes encontraron que la chance de preñez disminuye a medida que avanzan los DEL.

El porcentaje de vacas con ES post-MET fue del 21%, lo que coincide con el 17% reportado por Madoz y col. (2013) en rodeos en Argentina. Otros grupos de investigación extranjeros han informado prevalencias más elevadas, del 34 y 35% (Kasimanickam y col., 2005), del 52% (Hammon y col., 2006) y del 53% (Gilbert y col., 2005) en vacas postparto pero en rodeos de producción estabulada.

Nuestro hallazgo del 17% de las vacas con MET tenían fluido uterino coincide con lo reportado por Jaureguiberry y col. (2016) quienes informan que un 20% de las vacas repetidoras tenían >2 mm de fluido en la luz uterina. Si bien, el 17% de las vacas tuvo fluido en el útero, la fertilidad no se vio comprometida

porque las vacas se preñaron rápidamente (15 d antes con respecto a vacas PRE-MET). Por tanto, la salud uterina de las vacas que padecen una MET rápidamente se recupera y la proporción de vacas afectadas se halla dentro de los parámetros esperados. Esto concuerda con nuestra hipótesis que indica que la eficiencia reproductiva posterior a la MET no estaría comprometida por la salud uterina.

El hallazgo de que el 15% de las vacas post-MET tenían anestro a los 14 ± 3 d después de la MET coincide con el 14% reportado por Galvão y col. (2004), y con Rhodes y col. (2003) quienes indican que entre el 13 y 48% de las vacas lecheras padecen anestro al comienzo de la temporada del servicio. Por tanto, estos resultados corroborarían la hipótesis de que las vacas que padecen MET rápidamente recuperan su actividad ovárica.

Finalmente, en este trabajo se observó que 19,5% (125/642) de las vacas con MET se rechazaron por problemas de salud y muerte (se las consideró como censura a la izquierda en los análisis de supervivencia) y, además, que otro 26,6% (171/642) de las vacas no registró SF (se las consideró como censura a la derecha en los análisis de supervivencia). Esto significa que el 46,1% (296/642) de las vacas no registraron un SF después de la MET. En este sentido, Hadley y col. (2006) y Nor y col. (2014) reportan una tasa media anual de rechazo en los rodeos lecheros que oscila entre el 19 y 38%. Por tanto, si considerásemos a todas las vacas que no registraron un SF durante el estudio como refugos, ese valor alcanzaría un 46,1% de rechazo, lo que sería levemente superior a los valores esperados previamente descritos.

Cabe mencionar que en el establecimiento donde se realizó este estudio, los refugos se basan primordialmente en la producción de leche. Por tanto, la

producción de leche actuaría como un factor protector contra el rechazo de las vacas (Rilanto y col., 2020). Lo que lamentablemente no podemos evaluar es si las causas de refugo (p.ej.: mastitis, cojeras, etc.) tienen alguna relación con las causas de MET. Tampoco se puede dilucidar si las fallas en lograr un SF guardan alguna vinculación con las propias causas de MET.

No obstante, como se mencionó previamente, el foco de nuestro estudio no se centró en los factores de riesgo de refugo y, por tanto, no podemos más que proponer que los motivos de refugo (tal como enfermedades) pudieron no solo haber influido en la tasa de rechazos si no también en las MET. Se ha reportado, por ejemplo, que la cojera clínica se asocia con la MET y con la muerte fetal 35 a 90 d post IA (Alawneh y col., 2011) y que vacas con mastitis clínica dentro de los 45 d post-IA se relaciona con mayor riesgo de perder la gestación durante los próximos 90 d (Risco y col., 1999).

Finalmente, hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer estudio que evalúa cómo es la salud del tracto reproductivo (flujo vaginal, fluido uterino y actividad ovárica) y qué ocurre con la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras que padecen MET dentro de la misma lactancia.

4.7 CONCLUSIONES.

Se concluye que las vacas que padecen MET restablecen rápidamente tanto la salud uterina como la funcionalidad ovárica y, además, que la fertilidad no permanece comprometida después de la MET dentro de esa misma lactancia.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones de este trabajo de tesis son: 1- que el número de partos y el balance energético son factores de riesgo de MET, debido a que la chance de padecer MET aumenta en las vacas multíparas y con una CC menor a 2,5 al momento de la MET; 2- que la MET impacta negativamente en la eficiencia reproductiva, debido a las vacas con MET tardan 108 días más en preñarse que sus compañeras; 3- que la presencia del virus de la VDVB es un factor de riesgo de MET, debido a que las vacas seropositivas o que seroconvierten tienen mayores chances de padecer MET que sus compañeras; 4- que se detectó la presencia de VDVB en el *conceptus* de vacas que seroconvirtieron para VDVB; 5- que las vacas que padecen MET no tienen afectada tanto la salud uterina como la funcionalidad ovárica; y finalmente, 6- que después de la MET la fertilidad no permanece comprometida dentro de esa misma lactancia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdalla H, Elghafghuf A, Elsohaby I, Nasr MAF. Maternal and non-maternal factors associated with late embryonic and early fetal losses in dairy cows. *Theriogenology* 2017; 100:16–23.
2. Ahmad A, Hooda OK, Kalyan A, Kamboj A, Mohammed S, Alhussien M, Reddi S, Gachuiwo P, Rautela A, Ahmad SA, Hooda OK, Kalyan A, Kamboj A, Mohammed S, Alhussien M, Reddi S, Shimray PG, Rautela A, Pandita S, Kapila S, De S, Dang A. *Theriogenology* Interferon-tau stimulated gene expression : A proxy to predict embryonic mortality in dairy cows. *Theriogenology* 2018; 120:61–67.
3. Alawneh JII, Laven RAA, Stevenson MAA. The effect of lameness on the fertility of dairy cattle in a seasonally breeding pasture-based system. *J Dairy Sci* 2011; 94:5487–5493.
4. Alnimer M, De Rosa G, Grasso F, Napolitano F, Bordi A. Effect of climate on the response to three oestrous synchronisation techniques in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002; 71:157–168.
5. Alvarado Pinedo M, Traveria G, Di Paolo A, Romero J, Valera A. Evaluación serológica pareada por virus neutralización para IBR y BVD de bovinos de la provincia de Buenos Aires, Argentina, en el período 2000-2008. *Rev Med Vet* 2009; 90:39–44.
6. Aragaw K, Sibhat B, Ayelet G, Skjerve E, Gebremedhin EZ, Asmare K. Seroprevalence and factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy cattle in three milksheds in Ethiopia. *Trop Anim*

- Health Prod 2018; 50:1821–1827.
7. Bañales P, Fernandez L, Repiso M, Gil A, Dargatz DA, Osawa T. A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Vet Parasitol* 2006; 139:15–20.
 8. Bartolome JA, Sozzi A, McHale J, Melendez P, Arteche ACM, Silvestre FT, Kelbert D, Swift K, Archbald LF, Thatcher WW. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows, II: Assigning protocols according to stages of the estrous cycle, or presence of ovarian cysts or anestrus. *Theriogenology* 2005; 63:1628–1642.
 9. Bauermann FV, Ridpath JF, Weiblen R, Flores EF. HoBi-like viruses: An emerging group of pestiviruses. *J Vet Diagnostic Investig* 2013; 25:6–15.
 10. Benavides B, Casal J, Diéguez JF, Yus E, Moya SJ, Armengol R, Allepuz A. Development of a quantitative risk assessment of bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 introduction in dairy cattle herds to improve biosecurity. *J Dairy Sci* 2020; 103:6454–6472.
 11. Borchardt S, Haimerl P, Pohl A, Heuwieser W. Evaluation of prostaglandin F 2 α versus prostaglandin F 2 α plus gonadotropin-releasing hormone as Presynch methods preceding an Ovsynch in lactating dairy cows: A meta-analysis. *J Dairy Sci* 2017; 100:4065–4077.
 12. Campero C, Cantón GJ, Moore DP. Abortos y otras pérdidas reproductivas en bovinos: diagnóstico y control. 1a. Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Hemisferio sur, 2017, p. 29-384.
 13. Campero C, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun*, 2003; 27:359–369.

14. Campero LM, Moreno-gonzalo J, Venturini MC, Moré G, Dellarupe A, Rambeaud M, Echaide IE, Valentini B, Campero CM, Moore DP, Cano DB, Fort M, Mota RA, Serrano-martínez ME, Cruz-vázquez C, Ortega-mora LM, Álvarez-garcía G. An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti- *Neospora caninum* antibodies in cattle. *Trop Anim Heal Prod* 2018; 50:75–84.
15. Campero LM, Venturini MC, Moore DP, Massola L, Lagomarsino H, García B. Experimental Parasitology Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. *Exp Parasitol* 2015; 155:8–12.
16. Cartmill JA, El-Zarkouny SZ, Hensley BA, Lamb GC, Stevenson JS. Stage of Cycle, Incidence, and Timing of Ovulation, and Pregnancy Rates in Dairy Cattle after Three Timed Breeding Protocols. *J Dairy Sci* 2001; 84:1051–1059.
17. Celi P, Merlo M, Da Dalt L, Stefani A, Barbato O, Gabai G. Relationship between late embryonic mortality and the increase in plasma advanced oxidised protein products (AOPP) in dairy cows. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23:527–533.
18. Chang YM, Andersen-Ranberg IM, Heringstad B, Gianola D, Klemetsdal G. Bivariate analysis of number of services to conception and days open in Norwegian Red using a censored threshold-linear model. *J Dairy Sci* 2006; 89:772–778.
19. Cheng Z, Abudureyimu A, Oguejiofor CF, Ellis R, Barry AT, Chen X, Anstaett OL, Brownlie J, Wathes DC. BVDV alters uterine prostaglandin

- production during pregnancy recognition in cows. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2016a; 15:1–34.
20. Cheng Z, Abudureyimu A, Oguejiofor CF, Ellis R, Barry AT, Chen X, Anstaett OL, Brownlie J, Wathes DC. BVDV alters uterine prostaglandin production during pregnancy recognition in cows. *Reproduction* 2016b; 151:605–614.
 21. Cheng Z, Chauhan L, Barry AT, Abudureyimu A, Oguejiofor CF, Chen X, Wathes DC. Acute bovine viral diarrhoea virus infection inhibits expression of interferon tau-stimulated genes in bovine endometrium. *Biol Reprod* 2017; 96:1142–1153.
 22. da Silva Silveira C, Armendano JI, Moore DP, Cantón GJ, Macías-Rioseco M, Riet-Correa F, Giannitti F. A comparative study of commercial ELISAs for antibody detection in the diagnostic investigation of *Neospora caninum*-associated abortion in dairy cattle herds in Uruguay. *Rev Argent Microbiol* 2019; 52:107–114.
 23. de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vallejo A. WinEpi : Working in epidemiology. An online epidemiological tool. In: *Proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*, Cairns (Australia). p 800.
 24. De Vries A. Economic Value of Pregnancy in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 2006; 89:3876–3885.
 25. Delooz L, Czaplicki G, Houtain JY, Dal Pozzo F, Saegerman C. Laboratory Findings Suggesting an Association Between BoHV-4 and Bovine Abortions in Southern Belgium. *Transbound Emerg Dis* 2017; 64:1100–

- 1109.
26. Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim Reprod Sci* 2006; 96:297–311.
 27. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals-The last five years. *Vet Parasitol* 2011; 180:90–108.
 28. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:323–367.
 29. Ealy AD, Seekford ZK. Symposium review: Predicting pregnancy loss in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2019; 102:11798–11804.
 30. El-kholy AA, Abdelrahman K, Soliman H. Rapid detection of BoHV-1 genomic DNA by loop-mediated isothermal amplification assay. *J Virol Methods* 2014; 204:81–85.
 31. El-Tarabany MS. The efficiency of new CIDR and once-used CIDR to synchronize ovulation in primiparous and multiparous Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2016; 173:29–34.
 32. Elischer MF, Sordillo LM, Siegford JM, Karcher EL. Short communication: Characterizing metabolic and oxidant status of pastured dairy cows postpartum in an automatic milking system. *J Dairy Sci* 2015; 98:7083–7089.
 33. Engelke J, Knaack H, Linden M, Feldmann M, Gundling N, Gundelach Y. Identification of embryonic / fetal mortality in cows by semi- quantitative detection of pregnancy-associated glycoproteins. *Livest Sci* 2015a; 178:363–370.
 34. Engelke J, Knaack H, Linden M, Feldmann M, Gundling N, Gundelach Y,

- Egli C, Greiner M, Beckers J, Sousa N., Meyerholz M, Hoedemaker M, Piechotta M. Identification of embryonic/fetal mortality in cows by semiquantitative detection of pregnancy-associated glycoproteins. *Livest Sci* 2015b; 178:363–370.
35. Fair T. The contribution of the maternal immune system to the establishment of pregnancy in cattle. *Front Immunol* 2015; 6:1–8.
 36. Ferguson J, Galligan DT, Thomsen N. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cows. *J Dairy Sci* 1994; 77:2695–2703.
 37. Ferreira LCL, Cooke RF, Marques RS. Effects of vaccination against foot and mouth disease virus on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. *Am Soc Anim Sci* 2016; 94:401–405.
 38. Fort M, Edelsten M, Maley S, Innes E. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in la Pampa, Argentina. *Acta Parasitol* 2015; 60:275–282.
 39. Fray MD, Mann GE, Clarke MC, Charleston B. Bovine viral diarrhoea virus: Its effects on ovarian function in the cow. *Vet Microbiol* 2000; 77:185–194.
 40. French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: Transmission and options for control. *Int J Parasitol* 1999; 29:1691–1704.
 41. Gabor G, Tóth F, Ózsvári L, Abonyi-Tóth Z, Sasser RG. Factors influencing pregnancy rate and late embryonic loss in dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 2008; 43:53–58.
 42. Galvão KN, Santos JEP, Juchem SO, Cerri RLA, Coscioni AC, Villaseñor

- M. Effect of addition of a progesterone intravaginal insert to a timed insemination protocol using estradiol cypionate on ovulation rate, pregnancy rate, and late embryonic loss in lactating dairy cows. *J Anim Sci* 2004; 82:3508–3517.
43. García-Ispuerto I, López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Nogareda C, López-Béjar M, De Rensis F. Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology* 2006; 65:799–807.
44. Garcia-Vazquez Z, Rosario-Cruz R, Ramos-Aragon A, Cruz-Vazquez C, Mapes-Sanchez G. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet Parasitol* 2005; 134:61–65.
45. Gard JA, Givens MD, Marley MSD, Galik PK, Riddell KP, Edmondson MA, Rodning SP. Intrauterine inoculation of seronegative heifers with bovine viral diarrhea virus concurrent with transfer of in vivo-derived bovine embryos. *Theriogenology* 2010; 73:1009–1017.
46. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2005; 64:1879–1888.
47. Giuliadori MJ, Delavaud C, Chilliard Y, Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido I, de la Sota RL. High NEFA concentrations around parturition are associated with delayed ovulations in grazing dairy cows. *Livest Sci* 2011; 141:123–128.
48. Giuliadori MJ, Magnasco R, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido I., Risco CA, de la Sota R. Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive

- performance. *J Dairy Sci* 2013a; 96:3621–3631.
49. Giuliadori MJ, Magnasco R, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Risco CA, de la Sota RL. Clinical endometritis in an Argentinean herd of dairy cows: Risk factors and reproductive efficiency. *J Dairy Sci* 2013b; 96:210–218.
 50. Grooms DL, Brock K V., Pate JL, Day ML. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhea virus. *Theriogenology* 1998; 49:595–605.
 51. Hadley GL, Wolf CA, Harsh SB. Dairy cattle culling patterns, explanations, and implications. *J Dairy Sci* 2006; 89:2286–2296.
 52. Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; 113:21–29.
 53. Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F₂ α , to prostaglandin e₂ in bovine endometrium. *Endocrinology* 2009; 150:1912–1920.
 54. Hill J, Gilbert R. Reduced quality of bovine embryos cultured in endometrium. *J Aust Vet* 2008; 86:312–316.
 55. Inchaisri C, Hogeveen H, Vos PLAM, van der Weijden GC, Jorritsma R. Effect of milk yield characteristics, breed, and parity on success of the first insemination in Dutch dairy cows. *J Dairy Sci* 2010; 93:5179–5187.
 56. Jaureguiberry M, Giuliadori M., Mang AV, Madoz LV, Pothmann H, Drillich M, de la Sota R. Short communication: Repeat breeder cows with

- fluid in the uterine lumen had poorer fertility. *J Dairy Sci* 2016; 100:3083–3085.
57. Jobst SM, Nebel RL, McGilliard ML, Pelzer KD. Evaluation of reproductive performance in lactating dairy cows with prostaglandin F₂ α , gonadotropin-releasing hormone, and timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000; 83:2366–2372.
 58. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J* 2005; 46:255–259.
 59. Kelton DF, Lissemore KD, Martin RE. Recommendations for Recording and Calculating the Incidence of Selected Clinical Diseases of Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 1998; 81:2502–2509.
 60. Khan FA, Prasad S, Gupta H. P. Effect of heat stress on pregnancy rates of crossbred dairy cattle in Terai region of Uttarakhand, India. *Asian Pacific J Reprod* 2013; 2:277–279.
 61. Kim IH, Jeong JK. Risk factors limiting first service conception rate in dairy cows and their economic impact. *Asian-Australasian J Anim Sci* 2019; 32:519–526.
 62. Lazzari G, Colleoni S, Duchi R, Galli A, Houghton FD, Galli C. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. *Reproduction* 2011; 141:625–632.
 63. Lee JI, Kim IH. Pregnancy loss in dairy cows : the contributing factors, the effects on reproductive performance and the economic impact. *J Vet Sci*

- 2007; 8:283–288.
64. Leroy JLMR, Hoeck V Van, Clemente M, Rizos D, Soom A Van, Uytterhoeven M, Bols PEJ. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality. *Hum Reprod* 2010; 25:768–778.
 65. Leroy JLMR, Rizos DB, Sturmey RC, Bossaert PA. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality : a focus on dairy cow fertility. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24:1–12.
 66. Lima FS, Bisinotto RS, Ribeiro ES, Greco LF, Ayres H, Favoreto MG, Carvalho MR. Effects of 1 or 2 treatments with prostaglandin on subclinical endometritis and fertility in lactating dairy cows inseminated by timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2013; 96:6480–6488.
 67. Lonergan P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. *Theriogenology* 2011; 76:1594–1601.
 68. López-Gatius F, García-Ispuerto I. Ultrasound and endocrine findings that help to assess the risk of late embryo/early foetal loss by non-infectious cause in dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 2010; 45:15–24.
 69. López-Gatius F, Pabón M, Almería S. Neospora caninum infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 2004a; 62:606–613.
 70. López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Hunter RH. Timing of early foetal loss for single and twin pregnancies in dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 2004b; 39:429–433.
 71. López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Hunter RHF. Progesterone supplementation during the early fetal period reduces pregnancy loss in

- high-yielding dairy cattle. *Theriogenology* 2004c; 62:1529–1535.
72. Lucy MC, Butler ST, Garverick HA. Endocrine and metabolic mechanisms linking postpartum glucose with early embryonic and foetal development in dairy cows. *Animal* 2014; 8:82–90.
73. Madoz LV, Giuliadori MJ, Jaureguiberry M, Plöntzke J, Drillich M, De la Sota RL. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 2013; 96:4333–4339.
74. Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi L, Jaureguiberry M, de la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci* 2014; 97:195–201.
75. Madoz LV, Plöntzke J, Albarracín D, Drillich M, de la Sota RL. Determinación de los puntos de corte para el diagnóstico de endometritis subclínica en Argentina. *Taurus* 2012; 54:29–35.
76. Madoz LV, Prunner I, Jaureguiberry M, Gelfert C, de la Sota RL, Giuliadori MJ, Drillich M. Application of a bacteriological on-farm test to reduce antimicrobial usage in dairy cows with purulent vaginal discharge. *J Dairy Sci* 2017; 100:3875–3882.
77. Marqués FJ, Battistessa EI, Peek SF, Raabis SM, Darien BJ. The effect of foot-and-mouth disease vaccination on early pregnancy loss in beef heifers in Argentina. *Prev Vet Med* 2019; 170:1–4.
78. Mockeliuniene V, Šalomskas A, Mockeliunas R, Petkevičius S, Mockeli R, Petkevič S, Mockeliuniene V, Šalomskas A, Mockeliunas R, Petkevičius S.

- Prevalence and epidemiological features of bovine viral diarrhoea virus infection in Lithuania. *Vet Microbiol* 2004; 99:51–57.
79. Mokhtari A, Kafi M, Zamiri MJ, Akbari R. Factors affecting the size of ovulatory follicles and conception rate in high-yielding dairy cows. *Theriogenology* 2016; 85:747–753.
80. Moore DP, Campero CM, Odeón AC, Posso MA, Cano D, Leunda MR, Basso W, Venturini MC, Späth E, Manuel C, Carlos A, Cano D, Basso W, Späth E. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet Parasitol* 2002; 107:303–316.
81. Moore DP, Reichel M, Spath E, Campero C. *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. *Trop Anim Health Prod* 2013; 45:1237–1241.
82. Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Venturini MC, Venturini L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet Parasitol* 2009; 160:51–54.
83. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res* 2007; 38:181–209.
84. Newcomer BW, Cofield LG, Walz PH, Givens MD. Prevention of abortion in cattle following vaccination against bovine herpesvirus 1: A meta-analysis. *Prev Vet Med* 2017; 138:1–8.
85. Nor NM, Steeneveld W, Hogeveen H. The average culling rate of Dutch dairy herds over the years 2007 to 2010 and its association with herd reproduction, performance and health. *J Dairy Res* 2014; 81:1–8.

86. Odeon A, Spath E, Paloma E, Leunda M, Fernandez Sainz I, Perez S, Kaiser G, Draghi M, Cetra B, Cano A. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Rev Med Vet* 2001; 82:216–220.
87. Oguejiofor CF, Cheng Z, Abudureyimu A, Anstaett OL, Brownlie J, Fouladi-Nashta AA, Wathes DC. Global Transcriptomic Profiling of Bovine Endometrial Immune Response In Vitro. II. Effect of Bovine Viral Diarrhea Virus on the Endometrial Response to Lipopolysaccharide1. *Biol Reprod* 2015; 93:.
88. OIE. Bovine viral diarrhoea. In: OIE, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* 5th Ed World Organisation for Animal Health Paris, Fr. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.07_BVD.pdf.
89. Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol Reprod* 2002; 66:1169–1177.
90. Pecora A, Pérez López J, Jordán MJ, Franco LN, Politzki R, Ruiz V, Alvarez I. Analysis of irradiated Argentinean fetal bovine serum for adventitious agents. *J Vet Diagnostic Investigation* 2020; 1–6.
91. Perry GA, Smith MF, Lucy MC, Green JA, Parks TE, MacNeil MD, Roberts AJ, Geary TW. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:5268–5273.
92. Pessoa GA, Paula A, Mach J, Calderaro V, Eduardo C, Leonardi P, Silveira F, Vogel FFSF, Francisco M, Filho DS, Iolanda M, Rubin B, Antonio C,

- Silva M, Martini AP, Trentin JM, Dalcin VC, Leonardi CEP, Vogel FFSF, de Sá Filho MF, Rubin MIB, Silva CAM. Impact of spontaneous *Neospora caninum* infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in grazing lactating dairy cows. *Theriogenology* 2016; 85:519–527.
93. Plöntzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Heuwieser W, Drillich M. Prevalence of clinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Reprod Domest Anim* 2011; 46:520–526.
94. Pohler KG, Green JA, Moley LA, Gunewardena S, Hung WT, Payton RR, Christenson LK, Geary TW, Smith MF. Circulating microRNA as candidates for early embryonic viability in cattle. *Mol Reprod Dev* 2017; 84:731–743.
95. Pohler KG, Pereira MH., Lopes F., Lawrence J., Keisler D., Smith M., Vasconcelos JL., Green J. Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. *J Dairy Sci* 2016; 99:1584–1594.
96. Pugliesi G, Dalmaso de Melo G, Silva JB, Carvalhêdo AS, Lopes E, de Siqueira Filho E, Silva LA, Binelli M. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. *Theriogenology* 2019; 135:73–79.
97. Quintero Rodriguez LE, Rearte R, Domínguez G, de la Sota RL, Madoz LV, Giuliadori MJ. Late embryonic losses in supplemented grazing lactating dairy cows : Risk factors and reproductive performance. *J Dairy Sci* 2019; 102:9481–9487.
98. Raaperi K, Bougeard S, Aleksejev A, Orro T, Viltrop A. Association of herd

- BHV-1 seroprevalence with respiratory disease in youngstock in Estonian dairy cattle. *Res Vet Sci* 2012; 93:641–648.
99. Raaperi K, Orro T, Viltrop A. Epidemiology and control of bovine herpesvirus 1 infection in Europe. *Vet J* 2014; 201:249–256.
 100. Rearte R, Leblanc SJ, Corva SG, de la Sota RL, Giuliadori MJ. Effect of milk production on reproductive performance in dairy herds. *J Dairy Sci* 2018; 101:7575–7584.
 101. Reichel MP, McAllister MM, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT. Control options for neospora caninum-Is there anything new or are we going backwards? *Parasitology* 2014; 141:1455–1470.
 102. Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci* 2003; 86:1876–1894.
 103. Ribeiro E, Gomes G, Greco L, Cerri L, Vieria-Neto A, Monteiro PL., Lima F, Bisinoto R, Thatcher W, Santos JE. Carryover effect of postpartum inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2016; 99:2201–2220.
 104. Ribeiro E, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro APA, Favoreto M, Ayres H, Marsola RS, Martinez N, Thatcher WW, Santos JEP. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J Dairy Sci* 2013; 96:5682–5697.
 105. Rilanto T, Reimus K, Orro T, Emanuelson U, Viltrop A, Mõtus K. Culling reasons and risk factors in Estonian dairy cows. *BMC Vet Res* 2020; 16:1–

- 16.
106. Risco CA, Donovan GA, Hernandez J. Clinical mastitis associated with abortion in dairy cows. *J Dairy Sci* 1999; 82:1684–1689.
107. Rothman K, Greenland S, Lash T. In: Case-control studies. In: Williams L, Wilkins (eds) *Modern Epidemiology*, 3rd edn. Philadelphia, pp 111–147.
108. Rüfenach J, Schaller P, Audigé L, Knutti B, Küpfer U, Peterhans E. Fertility of Swiss Dairy Cattle. *Theriogenology* 2001; 56:199–210.
109. Rupprechter G, Noro M, Meotti O, Batista C, Adrien M de L, Barca J, Meikle A. Endocrine and reproductive parameters in sick and healthy primiparous and multiparous dairy cows. *Theriogenology* 2020; 141:173–179.
110. Santos JEP, Rutigliano HM, Filho MFS. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2009; 110:207–221.
111. Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci* 2004; 82–83:513–535.
112. Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJM, Wiltbank MC. Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. *J Dairy Sci* 2004; 87:905–920.
113. Shan J, Pow E, Tsang, Peter C, Perera R, L.W. D. Comparison of two laboratory extraction techniques for the detection of Epstein-Barr virus in the saliva of nasopharyngeal carcinoma patients. *J Investig Clin Dent* 2014; 5:104–108.
114. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining

- postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod* 2009; 81:1025–1032.
115. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006; 65:1516–1530.
116. Sibhat B, Ayelet G, Skjerve E, Gebremedhin EZ, Asmare K. Bovine herpesvirus-1 in three major milk sheds of Ethiopia: Serostatus and association with reproductive disorders in dairy cattle. *Prev Vet Med* 2018; 150:126–132.
117. Siddiqui M, Das Z, Bhattacharjee J, Rahman M, Islam M, Haque M, Parrish J, Shamsuddin M. Factors Affecting the First Service Conception Rate of Cows in Smallholder Dairy Farms in Bangladesh. *Reprod Domest Anim* 2013; 48:500–505.
118. Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Mee JF, Sreenan JM. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002; 71:1–12.
119. Soliman H, El-Matbouli M. An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *Virology* 2005; 2:1–8.
120. Spencer TE, Forde N, Lonergan P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants¹. *J Dairy Sci* 2016; 99:5941–5950.
121. Tenhagen BA, Drillich M, Surholt R, Heuwieser W. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: Reproductive and economic considerations. *J Dairy Sci* 2004; 87:85–94.

122. Tillard E, Humblot P, Faye B, Lecomte P, Dohoo I, Bocquier F. Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and sub-tropical conditions. *Theriogenology* 2008; 69:443–457.
123. Traveria G, Alvarado Pinedo M, Sanabria R, Di Paolo A, Suzuki K, Romero J. Estudio serológico en terneros de cría con infección natural de virus de IBR y BVD. *Rev Med Vet* 2011; 92:26–32.
124. Uddin M. MA, Ahasan Lutful AS., Islam KKMF, Islam MZ, Mahmood A, Islam A, Islam KKMF, Ahad A, Ahasan ASML, Islam KKMF, Islam Z, Mahmood A, Islam A. Seroprevalence of bovine viral diarrhea virus in crossbred dairy cattle in Bangladesh. *Vet World* 2017; 10:906–913.
125. Vanholder T, Leroy JLMR, Soom A Van, Opsomer G, Maes D, Coryn M, Kruif A De. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Anim Reprod Sci* 2005; 87:33–44.
126. VanRaden PM, Olson KM, Null DJ, Hutchison JL. Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *J Dairy Sci* 2011; 94:6153–6161.
127. Villar J. Sanidad en Bovinos. *Bol Técnico N°82 INTA Balcarce* pág.1–3.
128. Waldner CL, Kennedy RI. Cow-Calf Beef Herds and Persistent Infection With Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus in Calves. *Am J Vet Res* 2008; 69:916–927.
129. Walsh SW, Williams EJ, Evans ACOO. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2011; 123:127–138.

130. Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PLJ, Melo LF, Ochoa JC, Santos JEP, Sartori R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2016; 86:239–253.
131. Wiltbank MC, Sartori R, Sangsritavong S, Lopez H, Haughian J, Fricke P, Gumen A. Novel effects of nutrition on reproduction in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2001; 84:1–32.

ANEXOS

Anexo 3.1 Distribución proporcional de las muestras de vacas lecheras con MET (n=46) y sin MET (n=46), según los títulos neutralizantes e inhibición porcentual para diarrea viral bovina (VDVB) y para rinitraqueitis infecciosa bovina (IBR).

Técnica de Virus Neutralización									Test de ELISA				
¹ Título	² VDVB-1 MET (n)	VDVB-1 No-MET (n)	³ IBR-1 MET (n)	IBR-1 No-MET (n)	⁴ VDVB- 2 MET (n)	VDVB-2 No-MET (n)	⁵ IBR-2 MET (n)	IBR-2 No-MET (n)	⁶ Inhibición porcentual	BVDV-1 MET (n)	BVDV-1 No-MET (n)	BVDV-2 MET (n)	BVDV-2 No-MET (n)
0/0			3	1			3	8	<90	1			
1/2			2	3	3	7	2	3	95	1		4	
1/4			10	10			7	9	96			1	4
1/8	1	1	12	15			14	8	97	2	3	4	2
1/16			8	11	1		8	10	98	3	3	2	7
1/32	1	4	7	4	2	5	6	5	99	6	6	5	4
1/64	6	7	3	2	4	3	2	2	100	9	6	8	6
1/128	9	10	1		5	4	2	1	101	9	9	8	8
1/256	10	8			4	9	2		102	6	8	4	4
1/512	7	9			11	10			103	5	4	4	6
1/1024	9	4			5	6			104	1	2	2	1
1/2048	3	3			6	2			105	2	4	4	4
1/4096					3				106	1	1		
1/8192					2				107				

MET: muerte embrionaria tardía definida como la ausencia de latidos cardíacos del embrión o la evidencia de membranas fetales desprendidas o de estructuras flotantes detectadas mediante ultrasonografía transrectal 28 - 42 d post-IA

No-MET: se estableció como vacas con diagnóstico positivo de preñez 28 - 42 d post-IA mediante US

¹Título: Dilución utilizada;

²VDVB -1: título sérico para diarrea viral bovina al primer muestreo (día 0);

³VDVB -2: título sérico para diarrea viral bovina al segundo muestreo (día 28);

⁴IBR-1: título sérico para rinotraqueitis infecciosa bovina al primer muestreo (día 0);

⁵IBR-2: título sérico para rinotraqueitis infecciosa bovina al segundo muestreo (día 28 d después del día 0);

⁶Inhibición porcentual: determina la presencia o ausencia de anticuerpos de VDVB medido ópticamente a una longitud de onda de 450 nm, donde un resultado <50% es considerado negativo y un valor >50% positivo.

Anexo 3.2 Títulos séricos para *Neospora caninum* (*N. caninum*) en vacas lecheras con MET (n=46) y sin MET (n=46).

¹ Título (título de corte 200)	² <i>N. caninum</i> -1 MET (n)	<i>N. caninum</i> -1 No-MET (n)	³ <i>N. caninum</i> -2 MET (n)	<i>N. caninum</i> -2 No-MET (n)
<200 (negativo)	35	38	36	39
200	3	2	4	4
400	4	2	2	0
800	2	4	3	3
1600	2	0		
3200			1	0

MET: muerte embrionaria tardía definida como la ausencia de latidos cardíacos del embrión o la evidencia de membranas fetales desprendidas o de estructuras flotantes detectadas mediante ultrasonografía transrectal 28 - 42 d post-IA

No-MET: se estableció como vacas con diagnóstico positivo de preñez 28 - 42 d post-IA mediante US

¹Título: Dilución utilizada;

²*N. caninum*-1: título sérico para *N. caninum* el día 0;

³*N. caninum*-2: título sérico para *N. caninum* al segundo muestreo (28 d después del día 0).

