

Determinación de los puntos de corte para el diagnóstico de endometritis subclínica en Argentina

Madoz, L.V. ^(1,2), Plöntzke, J. ⁽³⁾, Albarracín, D. ^(3,4), Drillich, M. ⁽⁵⁾ y De la Sota, R.L. ^(1,2,6)

Resumen

La endometritis subclínica (ES) afecta negativamente a la reproducción de las vacas de tambo al aumentar el intervalo entre partos. Para su diagnóstico, se debe tomar una muestra citológica del útero y determinar el porcentaje de neutrófilos (PPMN) que se encuentra superficialmente en el endometrio. Distintos PPMN han sido utilizados como puntos de corte de diagnóstico en vacas estabuladas. No es posible extrapolar datos de explotaciones intensivas a las condiciones argentinas de producción, tampoco el uso de valores de corte arbitrarios, debido a que se pueden llegar a interpretar en forma errónea los resultados arribando a diagnósticos incorrectos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de la ES diagnosticada por la técnica de CB en Argentina y buscar los niveles de corte que se correspondan con una disminución de la eficiencia reproductiva. Se muestrearon y evaluaron 487 vacas con flujo vaginal normal entre 21 y 62 días postparto (dpp). Los datos fueron analizados por SAS y SigmaPlot. Las curvas ROC (acrónimo de Característica Operativa del Receptor) obtenidas arrojaron valores de corte de 8, 6, 4 y 5 PPMN para los intervalos 21-33, 34-47, 48-62 y 21-62 dpp respectivamente. Las vacas con ES tuvieron menor tasa de concepción al primer servicio (16,2%) y tuvieron 29 días más de abiertas comparados con vacas sin ES.

Palabras clave: Curva ROC; endometritis subclínica; cytobrush; puntos de corte.

Determining thresholds for the diagnosis of subclinical endometritis in Argentina

Summary

Subclinical endometritis (SE) adversely affects the reproduction of dairy cows by increasing the number of days open. For diagnosis of subclinical endometritis, it is necessary to take a cytological sample of the uterus and determine the percent of neutrophils (PPMN) present at the endometrial surface. Different percentages have been used as diagnostic cutoffs in dairy cows. It is not possible to extrapolate data of intensive productions to Argentine pastoral conditions, or to use arbitrary cutoff values. This could result in erroneous interpretation of results and misdiagnosis of subclinical endometritis. The aim of this study was to validate cytobrush technique in our country and find cutoff values which correspond to a real decline in reproductive efficiency. For this work 487 cows with normal vaginal discharge between 21 and 62 days postpartum (dpp) were sampled and subclinical endometritis was diagnosed. Data were analyzed by SAS and Sigma Plot. ROC (Receiver Operating Characteristic) curves generated cutoff values of 8, 6, 4 and 5 PPMN for the intervals 21-33, 34-47, 48-62 and 21-62 dpp, respectively. Cows with subclinical endometritis had a 16.2% reduction in first conception rate and had 29 more open days than cows without subclinical endometritis..

Key words: ROC curves; subclinical endometritis; cytobrush; thresholds.

(1) Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

(2) CONICET, Av. Rivadavia 1917, Capital Federal, Argentina.

(3) Práctica Privada.

(4) Cátedra de Patología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

(5) Clínica de Rumiantes, Universidad de Medicina Veterinaria, Viena, Austria.

(6) E-mail: dairymadoc82@gmail.com

Recibido: 8 de junio de 2012.

Aceptado: 28 de junio de 2012.

Taurus Año 14 N° 54: 29 - 35

Introducción

Dentro de las afecciones de las vacas de tambo, las enfermedades del útero tienen una gran importancia productiva, reproductiva y económica. A partir de la finalización del puerperio clínico (21 días postparto, dpp), se comienzan a diagnosticar las endometritis. En estos casos, el animal no presenta compromiso sistémico de su salud, ya que la inflamación se encuentra limitada únicamente a la capa más interna del útero, el endometrio ⁽¹⁷⁾.

La endometritis clínica (EC) cursa con descargas uterinas que varían de mucopurulentas a purulentas con olor fétido, las que pueden complicar la involución total del útero y así afectar a la vida reproductiva del vientre ^(6,17).

En cambio, la endometritis subclínica (ES) se diagnostica en vacas que presentan flujo translucido y sin flóculos de pus, llamado flujo cero o normal. Las vacas que presentan ES sólo pueden ser diagnosticadas por algún método complementario, como el cepillado del endometrio (cytobrush, CB), y el lavaje uterino o el hisopado. De los métodos conocidos, el CB ha demostrado ser la mejor técnica, principalmente por su practicidad y por no alterar la morfología de las células ⁽¹³⁾. Las citologías obtenidas se evalúan al microscopio óptico y se determina el PPMN sobre la cantidad de células totales. El punto de corte (PPMN) mínimo necesario para que una vaca sea clasificada como con ES, varía según los días postparto del animal, disminuyendo a medida que avanza el puerperio.

Según gran parte de las publicaciones, se podría considerar que en ausencia de EC una vaca es diagnosticada positiva a ES cuando la citología endometrial presenta ≥ 18 PPMN para muestras tomadas entre los 21-33 dpp, o ≥ 10 PPMN para muestras entre 34-47 dpp; ^(12,17). A pesar de que estos valores de corte son los aceptados por la mayoría de los investigadores, no existe consenso total, variando los valores de corte entre 4 y 25 PPMN ^(9,11). Debido a estas diferencias en el diagnóstico, la interpretación y la comparación de resultados entre diferentes estudios se hace controversial. Esto se complica más aún, al extrapolar datos reproductivos relacionados con ES de animales estabulados a animales en producción pastoril; ya que la prevalencia de ES en Argentina, -al igual de lo que sucede con la EC-, es más baja que en Europa y en Norteamérica, muy probablemente debido a las diferencias en los sistemas de producción.

A nuestro conocimiento, no existen trabajos realizados en condiciones de producción Argentina que determinen los valores de corte de a través de la aplicación de curvas ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor). Las curvas ROC permiten determinar valores exactos por sobre los cuales la eficiencia reproductiva se ve afectada, sin necesidad de extrapolar datos de otros sistemas de explotación que poco tienen que ver con la situación de la lechería en nuestro país.

En resumen, no existe un punto de corte para el diagnóstico de ES que indique una real disminución en la eficiencia reproductiva que pueda ser aplicado directamente al sistema argentino de explotación pastoril. Los estudios publicados fueron llevados a cabo en su mayoría en explotaciones intensivas y varían en los puntos de corte que aplican y en los dpp de los animales muestreados. Esto hace que las comparaciones, y más aún la extrapolación de estos datos al sistema argentino, no reflejen la situación real de las hembras lecheras, generando posibles interpretaciones erróneas.

El objetivo del trabajo fue determinar la prevalencia de la ES diagnosticada por la técnica de CB en Argentina y buscar los niveles de corte que se correspondan con una disminución de la eficiencia reproductiva de acuerdo a la metodología descrita por Dohoo ⁽⁵⁾, evitando así extrapolar en forma directa resultados de trabajos llevados a cabo bajo sistemas intensivos.

Materiales y métodos

Diseño experimental y animales

El estudio se llevó a cabo en cuatro tambos comerciales de la provincia de Buenos Aires; ubicados en América, Brandsen, Carlos Casares y Carmen de Areco. Se utilizaron vacas ($n=385$) de raza Holando Argentino en lactancia. Las vacas fueron examinadas entre los 21 y 62 dpp durante la visita mensual del veterinario asesor del establecimiento. En dicha visita, las vacas eran observadas externamente para detectar la presencia de descargas externas de flujo uterino en la cola, periné y vulva, e internamente mediante el examen del flujo vaginal (flujeo). Aquellas vacas que poseían algún grado de contenido pus en su flujo vaginal (flujo mucopurulento, purulento o purulento con olor fétido), fueron clasificadas como con EC y fueron descartadas del estudio. Asimismo, no fueron

incluidas en el estudio las vacas que habían recibido terapia antibiótica durante la semana previa al momento del estudio.

A cada vaca se le tomó una muestra de citología endometrial por medio de la técnica de CB; para esto se realizó un cepillado del endometrio de cada vaca por medio de un cepillo estéril (Medibrush, Argentina) adosado a la parte anterior de una pistoleta de acero inoxidable y protegido de la contaminación por una vaina plástica descartable (IMV, Francia). Una vez obtenida la muestra, el cepillo era rotado sobre un portaobjetos, el cual se fijaba y teñía (tinción 15, Biopur, Argentina) para la evaluación microscópica.

Las muestras eran evaluadas a 400X para determinar el PPMN sobre un total de 200 células. Posteriormente, el diagnóstico de gestación se realizó mediante palpación transrectal entre los días 35 y 65 post IA.

Análisis estadístico

Las medidas de eficiencia reproductiva analizadas fueron el intervalo parto-primero servicio (IP1S), el intervalo parto-concepción o días de vaca vacía (IPC), el porcentaje de preñez a la primera inseminación (PP1IA), el porcentaje de preñez a los 100 dpp (PRE100), y el porcentaje de vacas vacías a los 200 dpp (VAC200).

El punto de corte del PPMN fue obtenido mediante el análisis de la curva ROC⁽⁵⁾ utilizando el paquete estadístico y de gráficos SigmaPlot 11® (Systat Software Inc., San José, CA, USA). Se graficó la sensibilidad y la especificidad para cada PPMN posible en un curva ROC con la mediana de 100 días de IPC (días de vaca vacía) para la población en estudio. Los intervalos de dpp para los que se realizó el análisis de la curva ROC fueron los intervalos de 21-33 (INT21-33), de 34-47 (INT34-47), de 48-62 (INT48-62) y de 21-62 dpp (INT21-62).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico de SAS 9.1⁽⁴⁾. Los modelos se construyeron mediante la técnica de eliminación manual paso a paso. El valor de P de <0,15 fue utilizado como criterio de inclusión, y el valor de P>0,15 fue utilizado como criterio de exclusión.

Para verificar la asunción de proporcionalidad del riesgo de preñez de las vacas con y sin ES, los datos fueron estratificados mediante la variable ES, y una función de sobrevivencia de Kaplan-Meier

fue estimada para cada grupo con el procedimiento LIFETEST de SAS⁽¹⁾. Los estimadores de la función de sobrevivencia de Kaplan-Meier fueron utilizados para calcular las medianas del IPC y para graficar una función de empalme suave (spline) con el paquete estadístico y de gráficos SigmaPlot 11® (Systat Software Inc., San José, CA, USA).

La tasa de riesgo de preñez fue estimada utilizando un análisis multivariado de sobrevivencia mediante el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox con el procedimiento PHREG de SAS⁽¹⁾. El número de lactancias y la estación del parto fueron utilizados como covariables en el análisis. En el modelo de Cox, el cual es un método muy utilizado para análisis de supervivencia, la variable de respuesta se expresó como la tasa de riesgo de preñez, que representa la cuantificación del riesgo instantáneo de preñez por unidad de tiempo, o sea la velocidad a la que las vacas quedan preñadas diariamente⁽⁶⁾.

Por último, las variables dicotómicas como el PP1IA, el PRE100, y el VAC200 fueron analizados por regresión logística con el procedimiento GENMOD de SAS⁽²⁾.

Se eliminaron los registros de animales con datos incompletos, quedando 385 vacas para el cálculo de prevalencia y 347 animales para realizar el análisis estadístico de la eficiencia reproductiva. Para el análisis de la curva ROC, el cálculo de los valores de corte, el análisis de sobrevivencia de Kaplan-Meier y para el análisis multivariado de sobrevivencia mediante el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox se utilizaron 319 vacas que poseían los datos de PPMN e IPC.

Resultados

La curva ROC identificó como puntos de cortes a ≥ 8 PPMN para el INT21-33, ≥ 6 % para el INT34-47, ≥ 4 % para el INT48-62 y 5% para el INT21-62 (Figura 1. A, B, C y D, respectivamente). En la Tabla 1 se encuentra el área bajo la curva, el error estándar, el intervalo de confianza (IC) del 95% y la probabilidad para el valor de corte para cada intervalo analizado. Usando los puntos de corte obtenidos de las curvas ROC, la prevalencia de ES calculada sobre vacas negativas a EC (n=385) fue de 21,5%, 16,0%, 16,0% y 19,7% para los INT21-33, INT34-47, INT48-62 y INT21-64, respectivamente.

La Tabla 2 muestra la eficiencia reproductiva de

Tabla 1. Análisis de curva ROC para estimar el porcentaje de corte de PMN, el área bajo la curva, el error estándar (EE), el 95% del intervalo de confianza (IC) y la probabilidad (P) para los intervalos de 21-33, 34-47, 48-62 y 21-62 dpp.

	n	% PMN	Área	EE	95% IC	P
21-33 dpp	78	8,0	0,65	0,06	0,52-0,77	0,02
34-47 dpp	150	6,0	0,59	0,04	0,49-0,68	0,05
48-62 dpp	91	4,0	0,62	0,05	0,50-0,74	0,03
21-62 dpp	319	5,0	0,60	0,03	0,54-0,67	0,0008

Tabla 2. Razón de probabilidad (RP) de preñez, 95% del intervalo de confianza (IC) y probabilidad del porcentaje de preñez a la primera inseminación (PP1IA), del porcentaje de preñez a los 100 dpp (PRE100) y del porcentaje de vacas vacías a los 200 dpp (VAC200) en vacas con endometritis subclínica (ES) comparado con vacas normales.

	Porcentaje	RP ¹	IC 95%	P
PP1IA				
Normal	45,2 (109/241)	Referencia	Referencia	
ES	29,0 (18/62)	0,49	0,27-0,99	0,02
PRE100				
Normal	54,3 (132/243)	Referencia	Referencia	
ES	37,5 (24/64)	0,50	0,28-0,86	0,01
VAC200				
Normal	8,6 (21/243)	Referencia	Referencia	
ES	15,6 (10/64)	1,95	0,87-4,39	0,10

¹ Regresión logística, procedimiento GENMOD de SAS.

las vacas normales y las vacas con ES. Las vacas con ES tuvieron una disminución del 16,2% del porcentaje de PRE1IA y del 16,8% porcentaje de PRE100 comparado con las vacas normales ($P < 0,02$, $P < 0,01$; respectivamente); y un aumento del 7% del porcentaje de VAC200 ($P < 0,10$). La relación entre la proporción de vacas vacías y los días vacías entre vacas normales y vacas con ES, se muestra en la Figura 2. Las vacas normales tendieron a preñarse más precozmente que las vacas con

ES para los distintos intervalos: 21 a 33 dpp (Figura 2.A; mediana de días vacíos [MDV]=89 vs 160 d, $P = 0,08$) y 34 a 47 dpp (Figura 2.B; MDV=90 vs 116,5, $P = 0,07$); 48 a 62 dpp (Figura 2.C; MDV=101 vs 132 d, $P = 0,05$) y 21 a 62 dpp (Figura 2.D; MDV=94 vs 123,5 d, $P = 0,006$; Tabla 3). El número de lactancias y la condición corporal al momento del muestreo afectaron el IP1S (Tabla 4); mientras que sólo el número de lactancias y la presencia de ES al momento del muestreo afectaron

Tabla 3. Análisis de sobrevivencia y análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox del intervalo parto 1 servicio (IP1S) y parto concepción (IPC) en vacas normales y con endometritis subclínica (ES).

	n	Mediana ¹	IC 95% ¹	P ¹	TR ²	IC 95% ²	P ²
IP1S							
Normal	255	68,0	66,0-70,0	0,96	Referencia	Referencia	0,95
ES	61	69,0	63,0-75,0		0,99	0,74-1,31	
IPC							
Normal	254	94,0	88,0-101,0	0,006	Referencia	Referencia	0,0098
ES	64	123,0	101,0-147,0		0,68	0,52-0,91	

¹ Análisis de sobrevivencia, procedimiento LIFETEST de SAS;

IC 95%: intervalo de confianza del 95%

² TR: Tasa de riesgo, regresión de riesgos proporcionales de Cox, procedimiento PHREG de SAS.

Tabla 4. Análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox¹ del intervalo parto 1 servicio (IP1S) y parto concepción (IPC).

	n	TR	IC 95%	P	
IP1S	212	Referente 0,80	Referente 0,61-1,06	0,13	
				Lactancia 1	
				≥2	
IPC	208	Referente 0,73	Referente 0,54-0,97	0,03	
				Lactancia 1	
				≥2	
IP1S	212	Referente 1,38	Referente 1,05-1,83	0,02	
				Condición Corporal ≤2,5	
				>2,5	
IPC	208	Referente 0,73	Referente 0,52-1,06	0,07	
				Diagnóstico de ES Normal, ES negativo	
				ES positivo	
IP1S	305	Referente 0,98	Referente 0,97-1,00	0,06	
				Porcentaje PMN ²	

Procedimiento PHREG de SAS; P<0,15 del efecto para entrar y salir del modelo por cada 1% de incremento del porcentaje de PMN, disminuye 1,3 % el riesgo instantáneo de preñez.

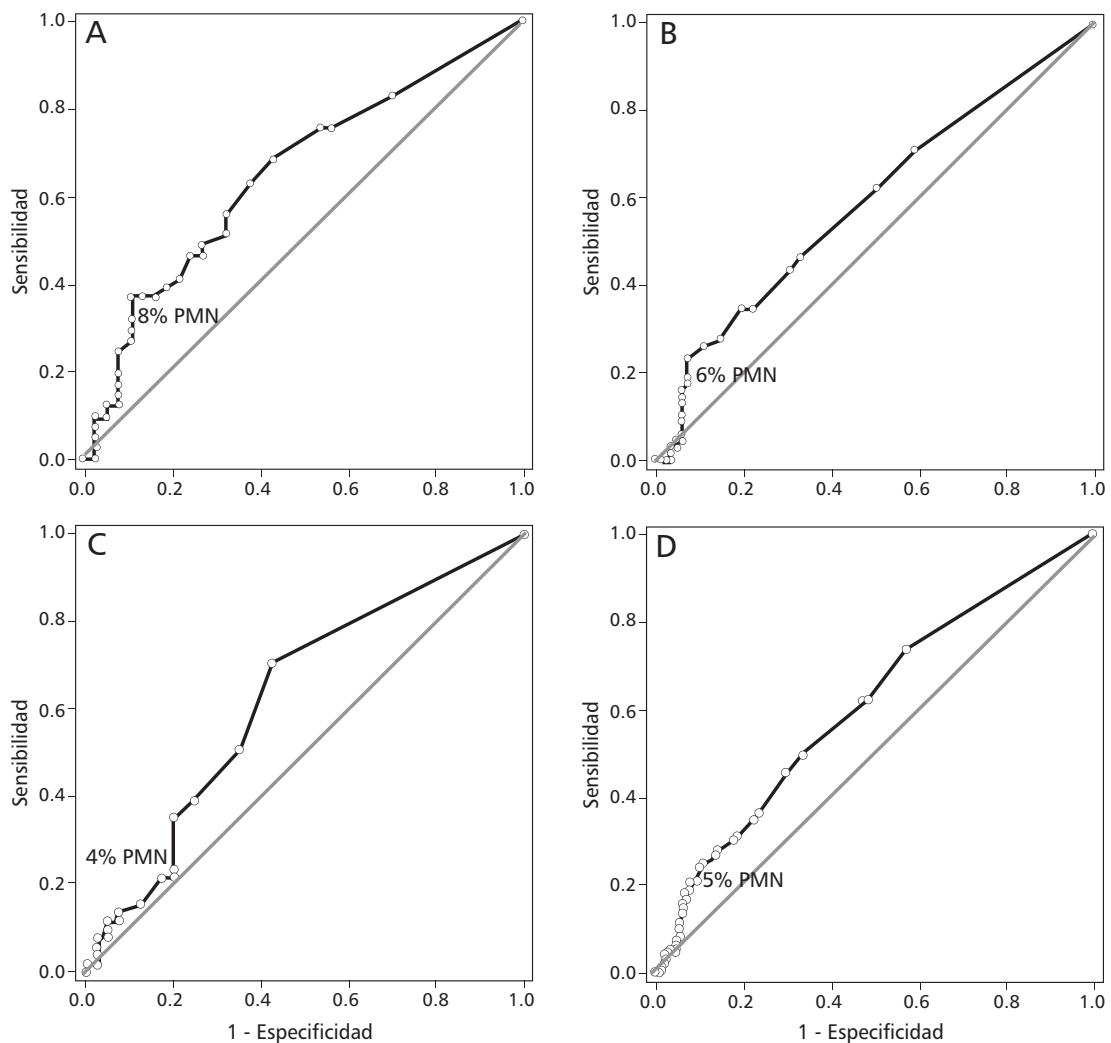


Figura 1. Curva ROC para estimar el porcentaje de corte de PMN para el intervalo de 21 a 33 (A, 8 PPMN), 34 a 47 (B, 6 PPMN), 48 a 62 dpp (C, 4 PPMN) y 21 a 62 dpp (D, 5 PPMN).

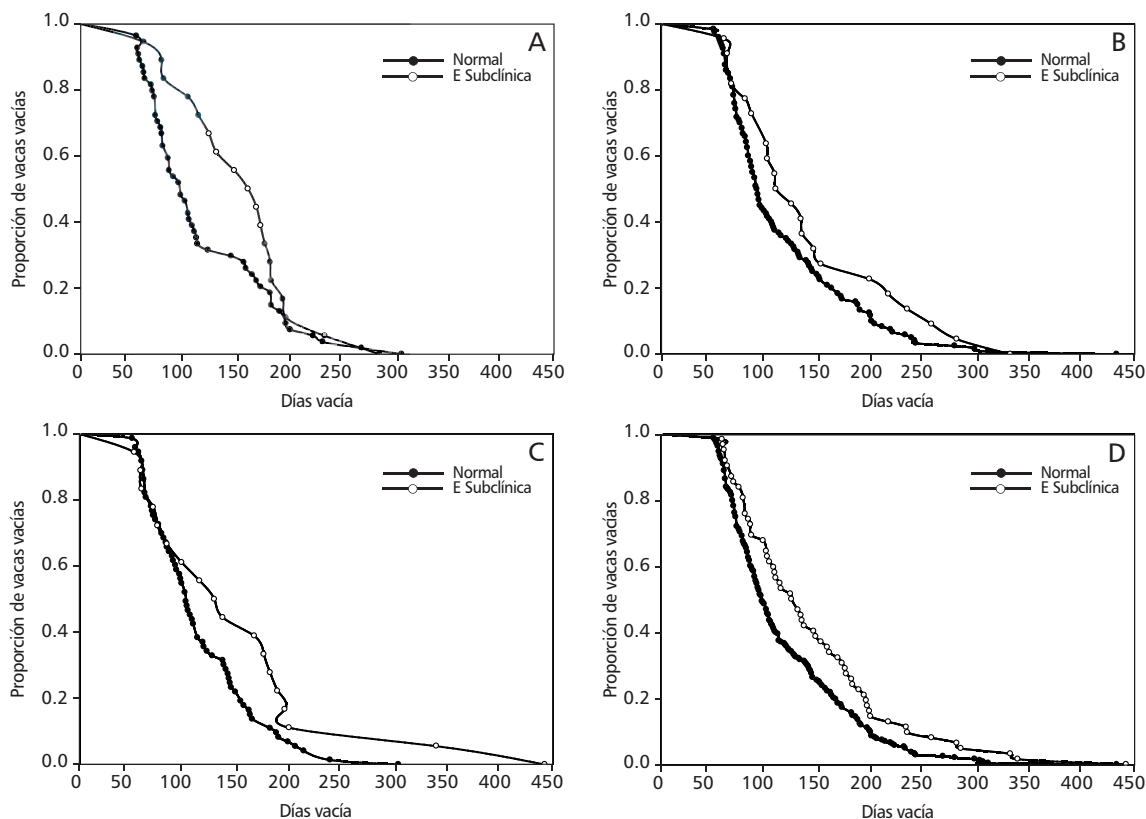


Figura 2. Curva de sobrevivencia del porcentaje de vacas vacías y los días de vaca vacía para el intervalo de 21 a 33 (A; mediana de días vacíos [MDV]=89 vs. 160 d, $P=0,08$), 34 a 47 (B; MDV=90 vs. 116,5, $P=0,07$), 48 a 62 dpp (C; MDV=101 vs. 132 d, $P=0,05$) y 21 a 62 dpp (D; MDV=94 vs. 123,5 d, $P=0,006$).

el IPC (Tabla 4). Por cada 1% de incremento del PPMN, disminuyó 1,3% el riesgo instantáneo de preñez (Tabla 4). Para vacas con ES comparadas con vacas sin ES, la razón de riesgo de preñez fue de 0,64 y la tasa de preñez relativa fue de 36% ($P<0,01$). Las vacas sin ES quedaron preñadas antes que las vacas con ES ($P<0,01$).

Discusión

Con la realización de este estudio se logró validar por primera vez la técnica de CB en nuestro país, y determinar los niveles de corte que se corresponden con una disminución de la eficiencia reproductiva. Además, también se pudo determinar la prevalencia de ES y su impacto sobre la eficiencia reproductiva en tambos comerciales.

Los valores de corte calculados en este trabajo fueron inferiores a los calculados en Canadá, 18% y 10%⁽¹²⁾ pero muy similares a los usados en USA por Gilbert, 5% (10), Galvão 8,5%, 6,5% y 4,0%⁽⁹⁾ y en Alemania por Raab, 5%⁽¹⁵⁾. Los valores de corte reportados en este trabajo demuestran que comienza a haber disminución de la eficiencia reproductiva

a partir de un PPMN del 8% al 4% según los dpp.

La prevalencia total de ES encontrada (17% 21-62 dpp) fue menor a la encontrada por Kasimanickam (35,1% entre 20-33 dpp y 34% entre 34-47 dpp;¹²), por Raab (41,3% entre 21-27 dpp y 16,4% entre 35-41 dpp;¹⁵), por Gilbert (53% 40-60 dpp;¹⁰) y por Hammon (51,8% 25-31 dpp;¹¹); similar a la encontrada por Feresin en Argentina (17,1% 15-80 dpp;⁷) y mayor que la hallada por Barlund (11,8% 28-41 dpp;³). En este punto, hay que tomar en consideración que en algunos de los trabajos^(3, 10, 11), la prevalencia fue medida sobre el total de vacas evaluadas y no sobre el total de vacas clínicamente sanas, por lo que se ve muy limitada la comparación con resultados obtenidos por otros autores.

A raíz del análisis de los datos, se confirmaron nuestras hipótesis de trabajo, ya que la ES disminuyó la eficiencia reproductiva de las vacas afectadas, aumentando los días de vaca vacía y su prevalencia fue menor que en condiciones de estabulación. El efecto negativo encontrado de la ES sobre la eficiencia reproductiva concuerda con la mayoría de

los informes al respecto ^(9, 10, 12, 16) y disiente sólo con uno, el cual informó no haber encontrado diferencias significativas entre vacas de tambo positivas y negativas a ES ⁽¹⁴⁾. Esta discrepancia podría deberse a una menor potencia de dicho estudio por la menor cantidad de animales incluidos (n=194), en comparación con el presente trabajo (n=385).

Conclusiones

La prevalencia de ES diagnosticada por la técnica de CB, en vacas lactantes de tambo bajo sistema de producción pastoril fue del 17%. Las vacas con ES tienen una reducción en la tasa de concepción al primer servicio, en la cantidad de vacas preñadas a los 100 días de lactancia, y un aumento en la cantidad de días abiertos comparado todo con vacas sin ES. Se identificaron como puntos de cortes a ≥ 8 PPMN para el INT de 21-33dpp, ≥ 6 PPMN para el INT de 34-47dpp, ≥ 4 PPMN para el INT de 48-62dpp, y $\geq 5\%$ para el INT de 21-62 dpp para el diagnóstico de ES por la técnica de CB.

Agradecimientos

Este proyecto fue realizado con fondos del Proyecto de Incentivos 11/V164 dirigido por RLS.

Bibliografía

- Allison, P., 1995. Survival Analysis Using SAS: A practical guide, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Allison, P., 1999. Logistic Regression Using SA: Theory and applications, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Barlund, C.S., Carruthers, T.D., Waldner, C.L., Palmer, C.W., 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69, 714-723.
- Cary, N.C. 1990. SAS/STAT user's guide (SAS Inst. Inc.).
- Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003. Veterinary epidemiology research. University of Prince Edward Island, Canada.
- Dominguez, G., Magnasco, M., Magnasco, R., Hernandez, J., Risco, C., de la Sota, R., 2006. Effect of clinical endometritis on reproductive performance in Holstein cows in Argentina. *Theriogenology* 66, 679-680.
- Feresin, F., Chesta, P., Bó, G. 2006. Prevalencia de endometritis bovina en vacas lecheras argentinas. In: *Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos*, Córdoba, Argentina.
- Fourichon, C., Seegers, H., Malher, X., 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 53, 1729-1759.
- Galvão, K., Frajblat, M., Brittin, S., Butler, W., Guard, C., Gilbert, R., 2009 Effect of prostaglandin F_{2α} on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 4906-4913.
- Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H.N., Frajblat, M., 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64, 1879-1888.
- Hammon, D.S., Evjen, I.M., Dhiman, T.R., Goff, J.P., Walters, J.L., 2006. Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunopathol* 113, 21-29.
- Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S., Johnson, W.H., 2004. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62, 9-23.
- Kasimanickam, R., Duffield, T.F., Foster, R.A., Gartley, C.J., Leslie, K.E., Walton, J.S., Johnson, W.H., 2005. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne* 46, 255-259.
- Plontzke, J., Madoz, L.V., De la Sota, R.L., Drillich, M., Heuwieser, W., 2010. Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Anim Reprod Sci* 122, 52-57.
- Raab, D., Drillich, M., Heuwieser, W. 2004. Diagnosis of subclinical endometritis and its effects on reproductive performance. In: *36th Annual Conference of the AABP*, Columbus, Ohio, USA. , 166.
- Salasel, B., Mokhtari, A., Taktaz, T., 2010. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology* 74, 1271-1278.
- Sheldon, I.M., Lewis, G.S., LeBlanc, S., Gilbert, R.O., 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65, 1516-1530.