

## Asociación entre la presentación de endometritis y los niveles de calcio sérico en vacas lecheras de crianza intensiva (Lima, Perú)

Association between the presentation of endometritis and serum calcium levels in dairy intensive cattle (Lima, Peru)

Irma Arévalo R.<sup>1</sup>, Luis Ruiz G.<sup>1,2</sup>, Néstor Chagray A.<sup>3</sup>, Rocío Sandoval M.<sup>1,4</sup>

### RESUMEN

El objetivo de la investigación fue estudiar la asociación entre la presentación de endometritis y los niveles de calcio sérico en las vacas lecheras de crianza intensiva de Lima, Perú. El estudio se realizó con 76 vacas Holstein. Se tomaron muestras de sangre el séptimo día del parto para determinar niveles de calcio mediante un espectrofotómetro, considerando 8 mg/dl como umbral para determinar la presencia de hipocalcemia subclínica. El diagnóstico de endometritis se realizó a los  $35 \pm 3$  días posparto utilizando el dispositivo comercial Metrichick®, para evaluar el aspecto del flujo de fondo de vagina, considerando como endometritis una puntuación superior o igual a 2 en la escala de McDougall. Se encontró diferencia significativa entre vacas múltiparas con y sin hipocalcemia en la presentación de endometritis ( $p < 0.02$ ), mostrando 1.65 veces más probabilidad de presentar endometritis que los animales con normocalcemia. Se concluye que existe una asociación entre la presentación de endometritis en las vacas múltiparas con hipocalcemia subclínica.

**Palabras clave:** nivel de calcio, endometritis, hipocalcemia subclínica, vacas lecheras, postparto

### ABSTRACT

The aim of the research was to study the association between the presentation of endometritis and serum calcium levels in intensively reared dairy cows from Lima, Peru. The study was carried out with 76 Holstein cows. Blood samples were taken on the

<sup>1</sup> Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>2</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

<sup>3</sup> Facultad de Ingeniería Agraria, Industrias Alimentarias y Ambiental, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, Huara, Lima, Perú

<sup>4</sup> E-mail: [rocio.sandoval@unmsm.edu.pe](mailto:rocio.sandoval@unmsm.edu.pe)

Recibido: 1 de mayo de 2020

Aceptado para publicación; 21 de noviembre de 2020

Publicado: 23 de febrero de 2021

seventh day of parturition to measure calcium levels using a spectrophotometer, considering 8 mg/dl as the threshold to determine the presence of subclinical hypocalcemia. The diagnosis of endometritis was made at  $35 \pm 3$  days postpartum using the commercial Metrichick® device to evaluate the appearance of vaginal fundus discharge, considering as endometritis a score greater than or equal to 2 on the McDougall scale. A significant difference was found between multiparous cows with and without hypocalcemia in the presentation of endometritis ( $p < 0.02$ ), showing 1.65 times more probability of presenting endometritis than animals with normocalcemia. It is concluded that there is an association between the presentation of endometritis in multiparous cows with subclinical hypocalcemia.

**Key words:** calcium level, endometritis, subclinical hypocalcemia, dairy cows, postpartum

## INTRODUCCIÓN

La demanda energética en una vaca recién parida se incrementa hasta en 2.5 veces con el fin de sostener la producción de leche (Bell, 1995; Reynolds *et al.*, 2003) en tanto que los requerimientos minerales, en especial el calcio se incrementa en más de 65% (DeGaris y Lean, 2008). En las primeras 24 h del parto puede ocurrir una hipocalcemia subclínica (Goff, 2014), de allí que se presenta una mayor movilización y reabsorción de calcio (DeGaris y Lean, 2008; Goff, 2008; Martin-Tereso y Martens, 2014), restableciéndose los valores séricos normales de calcio en los días siguientes (Martinez *et al.*, 2012; Chamberlin *et al.*, 2013). Sin embargo, ante fallas en los mecanismos de adaptación aparecen disfunciones metabólicas posparto (LeBlanc *et al.*, 2005; Ospina *et al.*, 2010a; Chapinal *et al.*, 2011), así como una menor producción de leche (Ospina *et al.*, 2010b; Chapinal *et al.*, 2011) y demoras en el reinicio de la actividad reproductiva (Ospina *et al.*, 2010a; Chapinal *et al.*, 2011).

Los casos de hipocalcemia en el ganado vacuno lechero son frecuentes (Goff, 2008), especialmente hipocalcemia subclínica (Reinhardt *et al.*, 2011), habiéndose reporta-

do hasta 73% de frecuencia en vacas multíparas en los primeros días del parto (Caixeta *et al.*, 2015). La hipocalcemia subclínica usualmente se define cuando los niveles de calcio en sangre se encuentran por debajo de 8.0 mg/dl (DeGaris y Lean, 2008; Goff, 2008; Chapinal *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2012; Reinhardt *et al.*, 2011).

La hipocalcemia subclínica en la vaca lechera se le relaciona con un mayor riesgo de ocurrencia de metritis (Martinez *et al.*, 2012) y de desplazamiento de abomaso (Chapinal *et al.*, 2011), así como un incremento en la saca (Duffield *et al.*, 1999; Seifi *et al.*, 2011). Además, las vacas al pastoreo que tienen concentraciones bajas de calcio en la primera semana posparto tienen mayores posibilidades de desarrollar múltiples trastornos clínicos durante la lactancia (Sepulveda-Varas *et al.*, 2015). Asimismo, la hipocalcemia subclínica se le asocia con el deterioro del rendimiento reproductivo (Jonsson *et al.*, 1999; McNally *et al.*, 2014; Heppelmann *et al.*, 2015).

Por lo tanto, el objetivo del estudio fue determinar la posible asociación entre los niveles de calcio sérico (NCa) y la presentación de endometritis en vacas lecheras de crianza intensiva de la región de Lima, Perú.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional prospectivo en dos establos lecheros ubicados en Lima, Perú. Se seleccionó un grupo de 76 vacas Holstein preñadas próximas al parto. Se colectaron muestras de sangre en el día 7 del parto y se hizo una revisión ginecológica para determinar posible endometritis a los  $35 \pm 3$  días posparto. Se excluyeron del estudio vacas que presentaron hipocalcemia clínica y aquellas que fueron tratadas con calcio intravenoso en la primera semana posparto.

Se determinaron los niveles séricos de calcio en las muestras de sangre (Mateus y Lopes da Costa, 2002; Chapinal *et al.*, 2011). Las muestras fueron centrifugadas a 2000 g durante 15 minutos y el suero resultante se almacenó en crioviales para su traslado al laboratorio dentro de las 5 horas de colección en un envase térmico. Los niveles de calcemia fueron determinados mediante el kit de diagnóstico Ca Color AA (Wiener Lab), siguiendo las indicaciones del fabricante. La lectura de la absorbancia se realizó empleando un espectrofotómetro (20 Genesys, ThermoSpectronic) a 570 nm, respetando un periodo máximo de 20 minutos posincubación. El nivel de calcio se determinó mediante la fórmula: Calcio (mg/dl) = Absorbancia de la muestra (10 mg/dl) / Absorbancia del estándar.

El diagnóstico de endometritis se realizó mediante el método de McDougall, donde se evalúa el aspecto del flujo de fondo de vagina, proporcionando un puntaje según la coloración y olor del flujo (McDougall *et al.*, 2007). Para esto, se empleó el dispositivo comercial Metricheck® (Simcro, Nueva Zelanda), que consiste en un capuchón de goma de 2.5 cm de diámetro unido a una barra de acero quirúrgico de 50 cm de largo y 0.8 cm de diámetro (Runciman *et al.*, 2009). El dispositivo fue desinfectado antes y después de usarlo en cada animal (solución de

agua y yodo povidona al 10%, dilución 1:10; Durani y Leaper, 2008). El dispositivo se introduce permitiendo que el capuchón de goma tome contacto con el fondo de la vagina y se retira en un ángulo de 45 °C para visualizar el contenido de la superficie cóncava del dispositivo

Las vacas fueron consideradas con endometritis cuando las presentaron una puntuación superior o igual a 2 y sin endometritis con una puntuación menor a 2 según la escala de McDougall *et al.* (2007). Asimismo, las vacas fueron clasificadas como normocalcémicas cuando presentaron valores de calcio séricos mayores o iguales a 8 mg/dl e hipocalcémicas subclínicas cuando presentaron valores menores a 8 mg/dl y no presentaron signos clínicos (Goff, 2008). La paridad fue clasificada en primíparas (vacas de primer parto) y múltiparas (vacas con más de un parto).

Se calcularon los porcentajes de presentación de endometritis según paridad y calcemia, y se calculó el riesgo relativo con su respectivo intervalo de confianza. La prueba de Chi-cuadrado y la prueba exacta de Fisher se utilizaron para determinar la asociación entre la presentación de endometritis con la paridad y la calcemia. Asimismo, los promedios de los valores de calcio sérico e intervalos de confianza según paridad y presentación de endometritis fueron comparados mediante la prueba de t-Student.

## RESULTADOS

No se encontró diferencia significativa en la presentación de endometritis entre vacas primíparas y múltiparas ( $p=0.24$ ; Cuadro 1). El riesgo relativo de las vacas primíparas en presentar endometritis fue mínimo (1.19). Por otra parte, las vacas con hipocalcemia subclínica presentaron más casos de endometritis en comparación con las vacas con normocalcemia ( $p<0.05$ ; Cuadro 2). Las

Cuadro 1. Frecuencia de endometritis en vacas Holstein a los  $35 \pm 3$  días posparto según el número de parto<sup>1</sup> (Lima, Perú)

	Normal		Endometritis		Total (n)
	n	%	n	%	
Primíparas	5	22.7	17	77.3	22
Múltiparas	19	35.2	35	64.8	54
Total	24	31.6	52	68.4	76

<sup>1</sup> Prueba Chi-cuadrado de Pearson: 0.29. Riesgo relativo: 1.19 (0.88-1.61)

Cuadro 2. Frecuencia de endometritis en vacas Holstein a los  $35 \pm 3$  días posparto según el estado de calcemia<sup>1</sup> (Lima, Perú)

	Normal		Endometritis		Total (n)
	n	%	n	%	
Normocalcemia	16	42.1	22	57.9	38
Hipocalcemia	8	21.1	30	79.0	38
Total	24	31.6	52	68.4	76

<sup>1</sup> Prueba Chi-cuadrado de Pearson: 0.05. Riesgo relativo: 1.36 (0.99-1.87)

Cuadro 3. Frecuencia de endometritis en vacas Holstein a los  $35 \pm 3$  días posparto según el estado de calcemia y el número de parto (Lima, Perú)

Paridad	Calcemia	Normal		Endometritis		Total (n)
		n	%	n	%	
Primíparas <sup>1</sup>	Normocalcemia	3	23.1	10	76.9	13
	Hipocalcemia	2	22.2	7	77.8	9
	Total	5	22.7	17	77.3	22
Múltiparas <sup>2</sup>	Normocalcemia	13	52.0	12	48.0	25
	Hipocalcemia	6	20.7	23	79.3	29
	Total	19	35.2	35	64.8	54

<sup>1</sup> Prueba exacta de Fisher (unilateral): 0.68; Riesgo relativo: 1.01 (0.67-1.53)

<sup>2</sup> Prueba Chi-cuadrado de Pearson: 0.02; Riesgo relativo: 1.65 (1.26-2.17)

Cuadro 4. Promedios, intervalo de confianza al 95% y rango del calcio sérico (mg/dl) según paridad, presentación de endometritis y presentación de endometritis estratificado por paridad

	Paridad		Endometritis		Primíparas		Multíparas	
	Primíparas	Multíparas	Normal	Endometritis	Normal	Endometritis	Normal	Endometritis
Vacas (n)	22	54	24	52	5	17	19	35
Media	8.28	7.91	8.30	7.88	8.34	8.27	8.28 <sup>a</sup>	7.70 <sup>b</sup>
IC <sup>1</sup> 95%								
Lím Mín	7.82	7.64	7.99	7.57	7.15	7.71	7.95	7.31
IC 95%								
Lím Máx	8.75	8.18	8.61	8.20	9.54	8.83	8.62	8.08
Mínimo	6.29	5.35	6.59	5.35	7.15	6.29	6.59	5.35
Máximo	10.00	10.07	9.68	10.07	9.68	10.00	9.23	10.07
Sig. <sup>2</sup>	0.15		0.06		0.89		0.04	

<sup>1</sup> Intervalo de confianza al 95% para el límite inferior y para el límite superior; <sup>2</sup> Significancia

vacas con hipocalcemia subclínica tuvieron 1.36 veces más probabilidad de presentar endometritis comparándolo con las vacas con normocalcemia (IC 95%: 0.99-1.87).

Al analizar en forma conjunta la presentación de endometritis con el estado de calcemia y paridad, no se encontraron diferencias significativas para el caso de las vacas primíparas y los niveles de calcio sérico ( $p=0.68$ ). Sin embargo, se encontró que las vacas multíparas con hipocalcemia subclínica presentaron más casos de endometritis en comparación que las vacas multíparas con normocalcemia ( $p=0.02$ ), lo cual significa que estas vacas con hipocalcemia subclínica

presentan 1.65 veces más probabilidad de presentar endometritis que aquellas con normocalcemia (Cuadro 3).

En el Cuadro 4 se observa que las vacas primíparas tuvieron niveles de calcemia ligeramente superiores que las vacas multíparas (8.28 vs. 7.91 mg/dl) y que las vacas sin endometritis presentaron niveles de calcemia ligeramente mayores a las vacas con endometritis (8.30 vs. 7.88 mg/dl). Sin embargo, esta tendencia solo se presentó en las vacas multíparas con endometritis, las cuales presentaron niveles más bajos que las vacas multíparas sin endometritis (8.28 vs. 7.70 mg/dl) ( $p<0.04$ ).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró un riesgo significativo que vacas con hipocalcemia subclínica tienen 1.36 veces más probabilidad de presentar endometritis que las vacas con normocalcemia. Esta relación significativa entre la hipocalcemia subclínica y la endometritis se presentó principalmente en las vacas multíparas, las cuales tuvieron 1.65 veces más riesgo de presentar endometritis cuando presentaron hipocalcemia subclínica. En este sentido, Risco *et al.* (1994), reportaron que los periodos de involución uterina más prolongados (15-32 días adicionales) se presentan en vacas con niveles bajos de calcio sérico. Kamgarpour *et al.* (1999) y Martínez *et al.* (2012) determinaron, asimismo, una disminución del 22% del riesgo relativo de desarrollar metritis por cada aumento de 1 mg/dl de Ca sérico en las vacas recién paridas. Sin embargo, otros autores no encontraron este tipo de asociación (Dubuc *et al.*, 2010; Cheong *et al.*, 2011).

Si bien la endometritis es una enfermedad multifactorial y resulta de la interacción de diversos factores intrínsecos y extrínsecos, es muy importante la identificación de la hipocalcemia subclínica como factor de riesgo para su presentación (Esposito *et al.*, 2014). La mayoría de los animales de primera lactancia son normocalcémicos, y solo el 6% de las vacas con paridad  $\geq 3$  presentan hipocalcemia clínica; sin embargo, la mayoría (60%) de los animales en este grupo de paridad experimentan hipocalcemia subclínica (Caixeta *et al.*, 2015).

Las vacas sin endometritis presentaron niveles de calcio sérico mayores a las vacas con endometritis (8.22 vs. 7.86), siendo esta diferencia significativa en el caso de las vacas multíparas (8.28 vs. 7.70). El calcio es indispensable en la regulación de la respuesta inmune y la contracción muscular (Mateus y Lopes da Costa, 2002; Bisinotto *et al.*, 2012; Hammon *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2011), procesos fisiológicos que explican los resul-

tados obtenidos en este estudio. Se ha demostrado que las concentraciones de calcemia en vacas con normocalcemia permiten una adecuada contracción del miometrio, lo cual promueve la eliminación de los loquios durante el posparto (Mateus y Lopes da Costa, 2002; Bisinotto *et al.*, 2012). Así también, las concentraciones adecuadas de calcio permiten una eficiente activación de los neutrófilos, que son el mecanismo de defensa predominante durante el proceso de involución (Hammon *et al.*, 2006; Burgos *et al.*, 2011).

La endometritis, como enfermedad multifactorial, resulta de la interacción de diversos factores (Esposito *et al.*, 2014), habiéndose identificado en este estudio a la hipocalcemia subclínica como factor de riesgo. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los animales de primera lactancia son normocalcémicos, y solo el 6% de las vacas con tres o más partos presentan hipocalcemia clínica; sin embargo, el 60% de esos animales experimentan hipocalcemia subclínica (Caixeta *et al.*, 2015).

Por otro lado, se reconoce que las vacas primíparas tienen mayor riesgo de presentar distocia que las vacas multíparas (Bruun *et al.*, 2002), y que la distocia es un factor de riesgo para la presentación de endometritis (Sheldon y Dobson, 2004; Bell y Roberts, 2007; Adnane *et al.*, 2017). Sin embargo, en este estudio no se pudo encontrar que las vacas primíparas presenten mayor probabilidad de presentar endometritis que la multíparas, posiblemente debido a que no se trabajó con vacas con partos distócicos.

## CONCLUSIÓN

Se encontró una asociación significativa ( $p < 0.05$ ) entre la presentación de endometritis con la presentación de la hipocalcemia subclínica en vacas lecheras multíparas de crianza intensiva de la zona de Lima, Perú.

## Agradecimientos

Al establo lechero de Lima y sus profesionales que continuamente colaboraron en el desarrollo de los trabajos de investigación del grupo de investigación.

## LITERATURA CITADA

1. **Adnane M, Kaidi R, Hanzen Ch, England G. 2017.** Risk factors of clinical and subclinical endometritis in cattle: a review. *Turk J Vet Anim Sci* 41: 1-11. doi: 10.3906/vet-1603-63
2. **Bell M, Roberts D. 2007.** The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology* 68: 1074-1079. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2007.08.010
3. **Bell AW. 1995.** Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci* 73: 2804-2819. doi: 10.2527/1995.7392804x
4. **Bisinotto R, Greco L, Ribeiro E, Martinez N, Lima F, Staples C, Thatcher W, et al. 2012.** Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. *Anim Reprod* 9: 260-272.
5. **Bruun J, Ersboll AK, Alban L. 2002.** Risk factors for metritis in Danish dairy cows. *Prev Vet Med* 54: 179-190. doi: 10.1016/S0167-5877(02)00026-0
6. **Burgos R, Conejeros I, Hidalgo M, Werling D, Hermosilla C. 2011.** Calcium influx, a new potential therapeutic target in the control of neutrophil-dependent inflammatory diseases in bovines. *Vet Immunol Immunop* 143: 1-10. doi: 10.1016/j.vetimm.2011.05.037
7. **Caixeta LS, Ospina PA, Capel MB, Nydam DV. 2015.** The association of subclinical hypocalcemia, negative energy balance and disease with bodyweight change during the first 30 days postpartum in dairy cows milked with automatic milking systems. *Vet J* 204: 150-156. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.-01.021
8. **Chamberlin WG, Middleton JR, Spain JN, Johnson GC, Eilersieck MR, Pithua P. 2013.** Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in post-parturient dairy cows. *J Dairy Sci* 96: 7001-7013. doi: 10.3168/jds.2013-6901
9. **Chapinal N, Carson M, Duffield TF, Capel M, Godden S, Overton M, Santos JE, LeBlanc SJ. 2011.** The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *J Dairy Sci* 94: 4897-4903. doi: 10.3168/jds.2010-4075
10. **Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Gilbert RO. 2011.** Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 94: 762-770. doi: 10.3168/jds.2010-3439
11. **DeGaris PJ, Lean IJ. 2008.** Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Vet J* 176: 58-69. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.029
12. **Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. 2010.** Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J Dairy Sci* 93: 5764-5771. doi: 10.3168/jds.2010-3429
13. **Duffield TF, Leslie KE, Sandals D, Lissemore K, McBride BW, Lumsden JH, Dick P, et al. 1999.** Effect of prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on milk production and milk components in early lactation. *J Dairy Sci* 82: 272-279. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75233-1
14. **Durani P, Leaper D. 2008.** Povidone-iodine: use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. *Int Wound J* 5: 376-387. doi: 10.1111/j.1742-481X.2007.00405.x
15. **Esposito G, Irons PC, Webb EC, Chapwanya A. 2014.** Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy

- cows. *Anim Reprod Sci* 144: 60-71. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.11.007
16. **Goff JP. 2008.** The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet J* 176: 50-57. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.020
  17. **Goff JP. 2014.** Calcium and magnesium disorders. *Vet Clin N Am-Food A* 30: 359-381. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.04.003
  18. **Hammon DS, Evjen IM, Dhiman TR, Goff JP, Walters JL. 2006.** Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet Immunol Immunop* 113: 21-29. doi: 10.1016/j.vetimm.2006.03.022
  19. **Heppelmann M, Krach K, Krueger L, Benz P, Herzog K, Piechotta M, Hoedemaker M, et al. 2015.** The effect of metritis and subclinical hypocalcemia on uterine involution in dairy cows evaluated by sonomicrometry. *J Reprod Develop* 61: 565-569. doi: 10.1262/jrd.2015-015
  20. **Jonsson NN, Fulkerson WJ, Pepper PM, McGowan MR. 1999.** Effect of genetic merit and concentrate feeding on reproduction of grazing dairy cows in a subtropical environment. *J Dairy Sci* 82: 2756-2765. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75532-3
  21. **Kamgarpour R, Daniel RC, Fenwick DC, Mcguigan K, Murphy G. 1999.** Post-partum subclinical hypocalcaemia and effects on ovarian function and uterine involution in a dairy herd. *Vet J* 158: 59-67. doi: 10.1053/tvj.1999.0348
  22. **LeBlanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. 2005.** Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *J Dairy Sci* 88: 159-170. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72674-6
  23. **Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Maunsell F, et al. 2012.** Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci* 95: 7158-7172. doi: 10.3168/jds.2012-5812
  24. **Martín-Tereso J, Martens H. 2014.** Calcium and magnesium physiology and nutrition in relation to the prevention of milk fever and tetany (dietary management of macrominerals in preventing disease). *Vet Clin N Am-Food A* 30: 643-670. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.07.007
  25. **Mateus L, Lopes da Costa L. 2002.** Periparturient blood concentrations of calcium, phosphorus and magnesium in dairy cows with normal puerperium or puerperal endometritis. *RPCV* 97: 35-38.
  26. **McDougall S, Macaulay R, Compton C. 2007.** Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 99: 9-23. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.03.017
  27. **McNally JC, Crowe MA, Roche JF, Beltman ME. 2014.** Effects of physiological and/or disease status on the response of postparturient dairy cows to synchronization of estrus using an intravaginal progesterone device. *Theriogenology* 82: 1263-1272. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.08.006
  28. **Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. 2010a.** Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *J Dairy Sci* 93: 3595-3601. doi: 10.3168/jds.2010-3074
  29. **Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR. 2010b.** Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. *J Dairy Sci* 93: 1596-1603. doi: 10.3168/jds.2009-2852



30. **Reinhardt TA, Lippolis JD, McCluskey BJ, Goff JP, Horst RL. 2011.** Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet J* 188: 122-124. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.03.025
31. **Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE. 2003.** Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J Dairy Sci* 86: 1201-1217. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73704-7
32. **Risco CA, Drost M, Thatcher WW, Savio J, Thatcher MJ. 1994.** Effects of calving related disorders on prostaglandin, calcium, ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 42: 183-203. doi: 10.1016/0093-691X(94)90675-9
33. **Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J. 2009.** Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalosporin on reproductive performance. *Aust Vet J* 87: 369-378. doi: 10.1111/j.1751-0813.2009.00469.x
34. **Seifi HA, Leblanc SJ, Leslie KE, Duffield TF. 2011.** Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet J* 188: 216-220. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.04.007
35. **Sepulveda-Varas P, Weary DM, Noro M, von Keyserlingk MA. 2015.** Transition diseases in grazing dairy cows are related to serum cholesterol and other analytes. *Plos One* 10: e0122317. doi: 10.1371/journal.pone.0122317
36. **Sheldon IM, Dobson H. 2004.** Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 82: 295-306. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.006