



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Efecto de la mastitis subclínica sobre la fertilidad en vacas de leche en los cantones: Cuenca, Girón, San Fernando de la provincia del Azuay y Déleg de la provincia del Cañar”

Tesis de grado previa a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autoras:

Tania Ximena Matute Deleg

CI:0105760706

Erika Estefanía Pinos Rojas

CI:0302193362

Director:

Dr. Jorge Bolívar Dután Sanango. Mg. Sc.

CI:0301093647

Cuenca, Ecuador

17-junio-2019



RESUMEN

Se determinó el efecto de la mastitis subclínica (MSC) sobre la fertilidad en vacas Holstein mestizas, en el Azuay y Cañar. Se realizaron tres ensayos; el primero evaluó el efecto de MSC sobre el porcentaje de preñez, se muestrearon 60 vacas con MSC y 60 sanas, el diagnóstico de MSC fue realizado mediante recuento de células somáticas, para determinar el porcentaje de preñez se usó la información de la primera inseminación pos diagnóstico de MSC. El segundo experimento valoró tamaño del folículo preovulatorio (TFPO) y el % de ovulación mediante ecografía, 54-56h posretiro del implante; el % de ovulación 48 h posteriores al día cero. Se valoraron dos tratamientos: T1 (n= 40) vacas con MSC y T2 (n= 40) vacas sanas; para homogenizar el día de ovulación se realizó una IATF convencional. El tercer ensayo determinó la relación entre estrógenos en sangre y líquido folicular, se utilizaron dos tratamientos: T1 (n= 10) vacas con MSC y T2 (n= 10) vacas sanas; la valoración hormonal se realizó mediante Electroquimioluminiscencia. El análisis estadístico fue realizado en SPSS versión® 25. Se estableció que las vacas con MSC presentaron menor porcentaje de preñez (48,3%), vs las sanas (68,3%) ($P < 0.05$). El TFPO y el % ovulación fueron similares entre tratamientos ($P > 0,05$). En cuanto a los niveles de estrógenos en suero sanguíneo, las vacas con MSC presentaron valores más altos (73,9 pg/ml) vs 37,4 pg/ml (vacas sanas) ($P < 0.05$), no así en líquido folicular ($P > 0,05$). Se concluye que la MSC impacta negativamente sobre la preñez.

Palabras clave: Mastitis subclínica. Estrógenos. Líquido folicular. Células somáticas. Preñez.



ABSTRACT

The effect of subclinical mastitis (MSC) on fertility in Holstein mestizo cows, in Azuay and Cañar was determined. Three trials were performed; the first one evaluated the effect of MSC on the percentage of pregnancy, 60 cows were sampled with MSC and 60 healthy, the diagnosis of MSC was made by somatic cell count, to determine the percentage of pregnancy the information of the first post-diagnosis insemination was used of MSC. The second experiment evaluated the size of the preovulatory follicle (TFPO) and the% of ovulation by ultrasound, 54-56h post-implant removal; % ovulation 48 h after day zero. Two treatments were evaluated: T1 (n = 40) cows with MSC and T2 (n = 40) healthy cows; To homogenize the day of ovulation, a conventional IATF was performed. The third trial determined the relationship between estrogen in blood and follicular fluid, two treatments were used: T1 (n = 10) cows with MSC and T2 (n = 10) healthy cows; The hormonal evaluation was performed by electrochemiluminescence. The statistical analysis was performed in SPSS version 25. It was established that cows with MSC had a lower percentage of pregnancy (48.3%), versus healthy ones (68.3%) ($P < 0.05$). The FPO and% ovulation were similar between treatments ($P > 0.05$). Regarding estrogen levels in blood serum, cows with MSC had higher values (73.9 pg / ml) vs 37.4 pg / ml (healthy cows) ($P < 0.05$), but not in follicular fluid ($P > 0.05$). It is concluded that MSC negatively impacts on pregnancy.

KEY WORDS: Subclinical mastitis. Estrogens. Follicular fluid. Somatic cells. Pregnancy.



ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA | 16 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 17 |
| 1.1. Objetivos | 19 |
| 1.1.1 Objetivo general | 19 |
| 1.1.2 Objetivos específicos | 19 |
| 1.2. Hipótesis..... | 19 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 20 |
| 2.1. Mastitis subclínica | 20 |
| 2.1.1. Agentes Etiológicos | 20 |
| 2.1.2. Bacterias Gram positivas..... | 20 |
| 2.1.3. Bacterias Gram negativas | 21 |
| 2.2. Diagnóstico de mastitis subclínica..... | 21 |
| 2.2.1. Prueba para Mastitis de California (CMT)..... | 22 |
| 2.2.2. Conductividad eléctrica | 22 |
| 2.2.3. Recuento de Células Somáticas (RCS)..... | 23 |
| 2.3. Respuesta inflamatoria de la Glándula Mamaria | 23 |
| 2.4. Efecto de la mastitis en la Reproducción..... | 25 |
| 2.4.1. Efecto de la mastitis en el eje Hipotálamo-hipófisis-ovario | 27 |
| 2.5. Líquido folicular | 29 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 31 |
| 3.1 Materiales | 31 |
| 3.1.1. Físicos..... | 31 |
| 3.1.2. Biológicos..... | 31 |
| 3.1.3. Químicos..... | 31 |
| 3.2. Métodos:..... | 31 |
| 3.2.1. Área de estudio | 31 |
| 3.2.2. Unidades de estudio..... | 32 |
| 3.2.3. Diseño experimental..... | 33 |
| 3.2.4. Ensayo 1 | 33 |
| 3.2.5. Ensayo 2 | 34 |
| 3.2.6. El ensayo 3 | 35 |
| 3.3. Análisis estadístico..... | 36 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 37 |
| 4.1. Resultados del objetivo 1 | 37 |
| 4.1.1. Porcentaje de preñez | 37 |
| 4.2. Resultados del objetivo 2 | 38 |
| 4.2.1 Actividad ovárica | 38 |
| 4.2.2. Valoración el tamaño del folículo preovulatorio | 39 |
| 4.2.3. Porcentaje de ovulación | 40 |
| 4.3 Resultados del objetivo 3 | 41 |
| 4.3.1. Valores de estrógeno (E 2) en suero sanguíneo | 41 |
| 4.3.2. Valores de estrógeno (E 2) en líquido folicular | 42 |
| 5. CONCLUSIONES | 44 |
| 6. RECOMENDACIONES | 45 |



| | |
|------------------------------|-----------|
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 46 |
| 8. ANEXOS | 53 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Liberación de Células fagocíticas, citotóxicos, citoquinas pro-inflamatorias mediante el proceso inflamatorio (40)..... | 26 |
| Figura 2 Alteración Eje Hipotálamo- hipófisis –ovarios (39). | 28 |
| Figura 3. División Político Administrativa del Ecuador, Señaladas las provincias de Azuay y Cañar (52). | 32 |
| Figura 4. Porcentaje de vacas preñadas y vacías en los dos tratamientos (T1=vacas sanas; T2= vacas enfermas). Prueba de Chi Cuadrado ($P < 0,05$). Fuente: autoras | 38 |
| Figura 5. Relación de actividad de ovario derecho e izquierdo en cada uno de los tratamientos. Prueba de Chi cuadrado ($P > 0,05$). | 39 |
| Figura 6. Media del Tamaño de folículo preovulatorio en cada tratamiento. Prueba de Mann-Whitney ($P > 0,05$) con valor de tendencia ($P = 0,07$). | 40 |
| Figura 7. Porcentaje de ovulación en cada tratamiento. Prueba Chi Cuadrado ($P > 0,05$) | 41 |
| Figura 8. Valores de estrógenos presentes en suero sanguíneo. Prueba T de Student ($P < 0,05$)..... | 42 |
| Figura 9. Valores de estrógenos presentes en líquido folicular. Prueba T de student ($P > 0,05$)..... | 43 |



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Interpretación para la prueba CMT.* 22



ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|------------------------------------------------------------------|----|
| Anexo 1. Hoja de campo 1 | 53 |
| Anexo 2. Flujo grama de la metodología del ensayo 1 | 54 |
| Anexo 3. Hoja de campo 2 | 55 |
| Anexo 4. Flujo grama de la metodología del ensayo 2..... | 56 |
| Anexo 5. Hoja de campo 3 | 57 |
| Anexo 6. Flujo grama de la metodología del ensayo 3..... | 58 |
| Anexo 7. Fotografías de las actividades de campo | 59 |
| Anexo 8. Registros reproductivos..... | 61 |
| Anexo 9. Análisis de leche en el laboratorio..... | 64 |
| Anexo 10. Ecografía de Folículo Preovulatorio..... | 66 |



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Tania Ximena Matute Deleg en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la mastitis subclínica sobre la fertilidad en vacas de leche en los cantones: Cuenca, Girón, San Fernando de la provincia del Azuay y Déleg de la provincia del Cañar", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca ,17 de junio del 2019

Tania Ximena Matute Deleg

C.I: 0105760706



Cláusula de Propiedad Intelectual

Tania Ximena Matute Deleg, autora del trabajo de titulación **“Efecto de la mastitis subclínica sobre la fertilidad en vacas de leche en los cantones: Cuenca, Girón, San Fernando de la provincia del Azuay y Déleg de la provincia del Cañar”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca ,17 de junio del 2019

Tania Ximena Matute Deleg

C.I: 0105760706



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Erika Estefanía Pinos Rojas en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Efecto de la mastitis subclínica sobre la fertilidad en vacas de leche en los cantones: Cuenca, Girón, San Fernando de la provincia del Azuay y Déleg de la provincia del Cañar", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca ,17 de junio del 2019

Erika Estefanía Pinos Rojas

C.I: 0302193362



Cláusula de Propiedad Intelectual

Erika Estefanía Pinos Rojas, autora del trabajo de titulación **“Efecto de la mastitis subclínica sobre la fertilidad en vacas de leche en los cantones: Cuenca, Girón, San Fernando de la provincia del Azuay y Déleg de la provincia del Cañar”**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca ,17 de junio del 2019

Erika Estefanía Pinos Rojas

C.I: 0302193362



AGRADECIMIENTO

Deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento.

A Nuestro Padre Creador por brindarnos la fortaleza y capacidad para cumplir con este anhelado sueño que después de un largo camino hoy se vuelve una realidad.

A esta prestigiosa Universidad, en especial a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y a todo el personal de la carrera Medicina Veterinaria y Zootecnia, por acogernos durante nuestra formación como profesionales y facilitarnos las instalaciones para llevar a cabo nuestra investigación.

A nuestro director de tesis Jorge Dután M.V.Z Mg Sc, por su colaboración en este trabajo investigativo.

A los docentes Luis Ayala M.V.Z Mg Sc, PhD; Omar Adrade M.V.Z Mg Sc; Fernando Perea M.V.Z Mg Sc, PhD; Pedro Barbecho M.V.Z Mg Sc ; Ramiro Rodas M.V.Z Mg Sc; Rafael Ochoa M.V.Z Mg Sc, por sus consejos, paciencia y dedicación.

A nuestros amigos Dr. Adrian Aguilar, Dr. Pablo Belesaca, Dra. Karina Coronel por brindarnos el soporte necesario en este periodo y a nuestros compañeros/amigos por cada una de las experiencias compartidas durante nuestra formación académica.



DEDICATORIA

A mis Padres Miguel y Leonor

Personas humildes, trabajadoras y de grandes valores, quienes han sabido guiarme y apoyarme durante todos estos años, recordándome que en la vida hay que ser perseverantes para alcanzar un propósito.

A mis hermanos.

Luz María, Teresa, Pedro, Miguel, Inés, Xavier, los cuales forman parte importante en mi vida, demostrando siempre unión y comprensión siendo cada uno de ellos un gran ejemplo a seguir.

A mi familia.

Mis queridos cuñados: Víctor, Milton, Eduardo, Patricia, Maricela y mis sobrinos: Sofí, Gaby, Miguelito, Naty, Ana Paula y la más nuevita Ivannia, quienes aportan de una u otra forma en la consolidación de este pilar fundamental para mí que es la familia.

TANIA XIMENA MATUTE DELEG.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo con mucho amor a:

Dios por ser el guía en mi caminar, por brindarme salud y bendecirme diariamente para alcanzar mis metas, por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

Mi mami Lucrecia Rojas Gallegos, por ser mi ángel, no está conmigo físicamente, pero desde el cielo cada día recibo su amor y apoyo infinito.

Mi papi Raimundo Pinos, por ser el pilar más importante en mi vida, por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional, papi hoy estoy aquí por el gran amor, fortaleza, valores y virtudes que nos ha inculcado siempre.

Mis queridos sobrinos, hermanos, tíos y demás familiares, por su cariño y apoyo incondicional, por sus consejos que aportaron positivamente en mi crecimiento personal y profesional, sé que me seguirán apoyando en esta nueva etapa.

ERIKA ESTEFANÍA PINOS ROJAS



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

MSC: Mastitis Subclínica

MC: Mastitis Clínica

TFPO: Tamaño de Folículo Preovulatorio

FPO: Folículo Preovulatorio

FSH: Hormona Folículo Estimulante

LH: Hormona Luteinizante

PGF2 α : Prostaglandina F2 α

GnRH: Hormona liberadora de Gonadotropina

P4: Progesterona

IATF: Inseminación Artificial a Tiempo Fijo

SNC: Staphylococcus Coagulasa Negativos

mS: miliSiemens

CMT: California Mastitis Test

RCS: Recuento de Células Somáticas

cs: células somáticas

PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

TLR: Receptores de tipo toll

CD14: Clúster de Diferenciación

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

ROS: Especies Reactivas del Oxígeno

ON: Óxido Nítrico

kDa: kiloDalton

IGF: Factor de Crecimiento Insulínico

EQL: Electroquimioluminiscencia

SSPL: Sostenibilidad de los Sistemas de Producción Láctea

LPS: Lipopolisacárido



1. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina, es un proceso inflamatorio de la glándula mamaria (1), considerada como la enfermedad más costosa que enfrenta la industria láctea (2), ya que cada caso le cuesta al productor entre de 100 a 200 dólares, ya sea por descarte de leche, tratamientos con antibióticos, caída de la producción y el tiempo empleado en el manejo de la vaca en tratamiento (3). Sin embargo, la gran mayoría de los productores no han visualizado la importancia de la mastitis subclínica, a pesar de que la frecuencia de presentación es mucho más alta que la mastitis clínica (4). Esto principalmente, porque esta no manifiesta signos clínicos visibles y se tornan crónicas (5).

En los últimos años se ha investigado el impacto negativo de la mastitis subclínica sobre el rendimiento reproductivo, llegando a determinar que genera un incremento en el reemplazo debido a la relación directa que tiene con la tasa de concepción (6). En este contexto, estudios recientes han asociado las infecciones intramamarias subclínicas adquiridas antes y después de la inseminación artificial con baja fertilidad (7). Por esta razón, Córdova *et al.*, (8), determinaron que la mastitis subclínica, que se produce después del servicio reduce el porcentaje de concepción hasta un 50%.

Esto basado en el concepto de que un proceso inflamatorio en la glándula mamaria, libera citoquinas, interleucinas, leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas incluyendo la $PGF2\alpha$ que son mediadores de la inflamación (9), generando un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos de la ubre, lo cual provocaría que la $PGF2\alpha$ sea absorbida por los vasos sanguíneos y alcance los ovarios (10). Además, las endotoxinas liberadas en el torrente circulatorio pueden llegar a modificar el equilibrio hormonal, que se expresaría en la disminución de los patrones de secreción del factor de liberación de la hormona GnRH, la foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) provocando lisis prematura del cuerpo lúteo y reabsorción embrionaria temprana (6).

Cuando la patología es adquirida antes de la concepción puede interrumpir los patrones hormonales del foliculo dominante o preovulatorio, disminuyendo la producción del estradiol por parte de las células de la granulosa, lo cual retrasaría la liberación de la hormona luteinizante y por ende la ovulación (11).



Lamentablemente, la información disponible de la relación entre la mastitis subclínica antes y después de la concepción es escasa y contradictoria.



1.1. Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la mastitis subclínica sobre las características del folículo preovulatorio, el porcentaje de ovulación, las concentraciones de estrógenos y fertilidad en vacas lecheras bajo un sistema de pastoreo en los cantones: Cuenca, Girón, San Fernando de la provincia del Azuay y Déleg de la provincia del Cañar.

1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la mastitis subclínica sobre el porcentaje de preñez resultado de la primera inseminación pos diagnóstico de mastitis subclínica.
- Valorar el tamaño del folículo preovulatorio y el porcentaje de ovulación, luego de un protocolo de sincronización (IATF) pos diagnóstico de mastitis subclínica.
- Determinar la relación entre los niveles de estrógenos presentes en sangre y en del líquido folicular, en vacas sanas y con mastitis subclínica.

1.2. Hipótesis.

¿La mastitis subclínica afecta al porcentaje de preñez, tamaño del folículo preovulatorio, porcentaje de ovulación y niveles de estrógenos presentes en sangre y en líquido folicular en vacas lecheras?



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Mastitis subclínica

La mastitis subclínica se caracteriza por la presencia de un microorganismo, en combinación con un conteo elevado de células somáticas en leche y esta puede desarrollar fácilmente una inflamación y no tener tratamiento (1). La mastitis subclínica (MSC) es difícil de detectar, dado que la enfermedad transcurre sin provocar signos de inflamación visibles como ocurre en la mastitis clínica (MC), en donde se observa la alteración en la composición de la leche tanto físicos como organolépticos (12) ; además, se da una disminución en la producción láctea, un incremento en la temperatura corporal y enrojecimiento o calor en los cuartos afectados (13).

2.1.1. Agentes Etiológicos

Se han identificado aproximadamente 140 especies de agentes causantes de mastitis, que se dividen en patógenos contagiosos y ambientales (1). *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativos* (SNC), *Streptococcus* y *Arcanobacterium pyogenes* son los principales agentes etiológicos de las infecciones tanto antes como después del parto (14). Otro método para clasificar es mediante tinción de Gram, es así que pueden clasificarse de manera confiable como Gram positivos o Gram negativos (15).

2.1.2. Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas que crecen en leche incluye un grupo que son tecnológicamente útiles, pero también hay contaminantes saprofitos y patógenos. Este grupo está compuesto por los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Clostridium* (16). Los *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis* generalmente son causantes de mastitis contagiosa dado que sus reservorios son la propia glándula mamaria y la leche de vacas infectadas (17).

Pinedo *et al.*, (18), sugieren que el efecto de las bacterias Gram positivas sobre la reproducción, pueden asociarse con pérdidas embrionarias en vacas lecheras al estimular la liberación de mediadores inflamatorios y pirexia. También la inoculación mamaria con *Streptococcus uberis* deprimió el comportamiento



estral y alteró las concentraciones hormonales, incluida la disminución de las concentraciones de estradiol preovulatorio y LH, además la infusión intramamaria de peptidoglicanos indujo un efecto de arrastre sobre las concentraciones de andrógenos y estrógenos foliculares en las vacas mastíticas (19).

2.1.3. Bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas dañan la leche y causan problemas gastrointestinales y otras enfermedades cuando exceden cierta concentración. Este grupo está compuesto por los géneros Pseudomonas, Aeromonas, Flavobacterium, Alcaligenes y Acinetobacter, y la familia Enterobacteriaceae; entre ellas las bacterias coliformes las cuales incluyen los géneros Escherichia, Citrobacter, Enterobacter y Klebsiella (16). Algunos de estos agentes son causantes de la mastitis ambiental, cuyo reservorio es el ambiente donde permanecen los animales y no las glándulas mamarias infectadas, siendo su principal vía de entrada, el canal del pezón (17).

Una mastitis causada por coliformes, ya sea temprana o tardía en la lactancia, puede afectar negativamente la función reproductiva, debido a que la endotoxina Gram negativa y varios mediadores celulares, en la función endocrina causan el incremento de los niveles séricos de $\text{PGF2}\alpha$, y a través de su acción luteolítica, altera el ciclo estral o provoca el aborto en las vacas (18).

2.2. Diagnóstico de mastitis subclínica

La inflamación de la glándula mamaria involucra una serie de cambios en la composición de la leche, que sirven de base para muchas pruebas de diagnóstico que se han desarrollado, uno de estos cambios más precoces es el aumento en el número de células somáticas que normalmente es menor a 200.000 cs/ml y que durante el proceso inflamatorio supera las 500.000 cs/ml (20).

En la mastitis subclínica, por ser una enfermedad de difícil identificación a simple vista, se han empleado pruebas de laboratorio y de campo para facilitar el diagnóstico entre las cuales están las pruebas químicas como: California Mastitis Test, conteo de células somáticas (13), método de conductividad eléctrica, entre otras, y estas proporcionan resultados inmediatos (21).



2.2.1. Prueba para Mastitis de California (CMT)

El CMT es una prueba de campo económica, sencilla y rápida, que detecta con buena sensibilidad y especificidad el estado de salud de la ubre. Se basa en la gelificación que tiene lugar cuando el ADN es liberado de las células somáticas presentes en la leche por la acción de un detergente aniónico como el alkyl-aril-sulfonato de sodio; por tanto, a mayor contenido celular en la leche, mayor gelificación (20) . Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases, desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifican (1) (Cuadro 1).

Tabla 1. Interpretación para la prueba CMT.

| Grado de CMT | Rango de células somáticas | Interpretación |
|--------------|----------------------------|---------------------|
| N (negativo) | 0 – 200.000 | Cuarto Sano |
| T (trazas) | 200.000 – 400.000 | Mastitis Subclinica |
| 1 | 400.000 – 1.200.000 | Mastitis Subclinica |
| 2 | 1.200.000 – 5.000.000 | Infeccion Seria |
| 3 | Más de 5.000.000 | Infeccion Seria |

Fuente: Mellenberger *et al.*, (2000) (22).

2.2.2. Conductividad eléctrica

Esta prueba mide la capacidad de conducción de corrientes eléctricas entre dos electrodos que son representadas en milisiemens (mS). Para detectar la mastitis se observan los cambios iónicos que ocurren durante la inflamación, ya que el flujo de sodio y cloro aumentan en procesos inflamatorios y aumenta el componente electrolítico de la leche (13). Consiste en un dispositivo que se sostiene con la mano, el cual tiene una copa empotrada donde se arrojan chorros de leche, se le encuentra como parte de algunos equipos de ordeño, o en forma de medidores portátiles (1) .Por otro lado, los factores que pueden afectar la conductividad eléctrica son: el estado de lactación, edad, estrés, ordeño, factores ambientales ocasionando resultados falso positivos o falsos negativos,



convirtiéndolo en un método no muy confiable en comparación a otros métodos convencionales (21).

2.2.3. Recuento de Células Somáticas (RCS)

El contenido de células somáticas en la leche nos permite tener un criterio sobre el estado funcional y salud de la glándula mamaria en estado lactante y debido a su estrecha relación con la composición de la leche, es un criterio de calidad muy importante (23). El RCS es un método diagnóstico utilizado en laboratorios y en campo, que consiste en la medición de las células somáticas, de tipo sanguíneo o epiteliales presentes en la leche, las cuales sirven como indicador de los problemas dados por la inflamación de origen infeccioso o traumático (13), puede ser realizada en la leche de; a) cuartos individuales, b) vacas individuales, c) el hato completo y d) un grupo de hatos (24).

Las células somáticas están presentes en las ubres sanas en una concentración que varía entre 100.000 y 200.000 cs/ml con una proporción de 1 a 11% de neutrófilos durante las primeras semanas, llegando a un 90% en procesos inflamatorios, se compone también de células de defensa como granulocitos, polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos (9), cabe destacar que el RCS es ligeramente más alto durante los primeros días y últimos de la lactancia (25).

La importancia biológica de las células somáticas estriba en la intervención de la defensa contra infecciones de la ubre (26). Por lo tanto, el uso del recuento de células somáticas para la detección de MSC podría evitar el sesgo subjetivo relacionado con la prueba de California Mastitis Test (CMT) y mejorar la estimación de la extensión del daño tisular y las pérdidas de rendimiento de la leche causadas por diferentes patógenos de mastitis (4). Es así que Echeverri *et al.*, (27) han demostrado que existe una relación lineal inversa entre el RCS por encima de 200.000 cs/ml y la producción de leche con una disminución del 2,5% de la producción por cada 90.000 - 100.000 cs/ ml incrementadas.

2.3. Respuesta inflamatoria de la Glándula Mamaria

Los tejidos asociados con el conducto del pezón o el canal del pezón forman la primera barrera contra las bacterias causantes de mastitis e incluyen la piel exterior, el músculo del esfínter, el epitelio escamoso estratificado del revestimiento del canal del pezón y la queratina (28). Una vez que las bacterias



o sus toxinas superan la primera línea de defensa del canal del pezón y alcanzan los tejidos altos, comienza a operar la segunda línea de defensa, que incluye factores humorales inespecíficos presentes en la leche o secreción de la ubre seca como: lactoferrinas, inmuno-lacto-peroxidasas, lizosimas fracciones del complemento y otros compuestos químicos (25). Además los mecanismos de defensas inmunológicos o específicos, ya sea de tipo humoral (inmunoglobulinas) o de base celular, incluyendo el sistema fagocítico (macrófagos y polimorfonucleares) y el sistema linfoide (linfocitos T y B) y estos constituyen las llamadas células somáticas (29).

La inmunidad innata es el tipo de inmunidad más universal y de actuación más rápida, por esta razón existen dos aspectos muy importantes a tener en cuenta en la defensa contra las infecciones intramamarias: 1) el brazo aferente (detecta), reconoce una variedad diversa de patógenos, y 2) el brazo eferente (efector), que mata a estos patógenos, cada brazo está dividido en componentes celulares, humorales, y las moléculas del complemento (30).

Es así que, una de las principales células efectoras del sistema inmune innato bovino es el neutrófilo que responden de modo inespecífico al reconocer determinados patrones moleculares relacionados a patógenos (PAMP) (31), la detección y reconocimiento de estas moléculas estimulan los receptores de tipo Toll (TLR) que están presentes en muchas células del sistema inmune y son potencializados por otros mediadores en la superficie de las células inmunes como el clúster de diferenciación proteica 14 (CD14) (6). Malinowski., (32) menciona que los mecanismos de defensa innato y adquirido son los más bajos desde la tercera semana de pre parto hasta la tercera semana de post parto y esta sensibilidad reducida incluye aspectos de la inmunidad sistémica y de la glándula mamaria, por ende el deterioro de la función innata e inmune es al menos parcialmente responsable de la prevalencia de la enfermedad durante el período pre parto.

En una enfermedad como la mastitis, la inflamación daña el epitelio secretor mamario y las células fagocíticas liberan radicales citotóxicos, citocinas pro-inflamatorias, y otras moléculas como el óxido nítrico (NO). Los niveles altos de NO reaccionan con aniones superóxido, creando radicales peroxinitrito, los



cuales oxidan los ácidos grasos de cadena larga en las membranas celulares, provocando la per oxidación lipídica y la formación de radicales libres (33).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan un papel esencial en la destrucción de bacterias, pero su exceso puede dañar tanto los fagocitos como otras células, y los tejidos mamaros durante la mastitis. También pueden contribuir al edema de la ubre, la fiebre de la leche e influir negativamente en el rendimiento reproductivo de las vacas (34). Es así que las ROS suprimen la síntesis de P4 a través de la inhibición de la P450scc citocromo, limitando el transporte intracelular de colesterol a las mitocondrias y los receptores de la hormona LH (35).

Se considera que tanto la ROS como el óxido nítrico (NO), intervienen en la señalización inter e intracelular, la generación de un exceso en ellos produce estrés oxidativo (36). Las concentraciones de ROS pueden desempeñar un papel clave tanto en la implantación como en la fertilización de ovocitos, también está involucrado en la etiología del desarrollo embrionario defectuoso y parece ser responsable de numerosos tipos de daño embrionario (37).

2.4. Efecto de la mastitis en la Reproducción

Estudios recientes han demostrado que la mastitis afecta el proceso reproductivo en varios niveles, desde la alteración en la actividad ovárica posparto y la ovulación, así como alteraciones en los procesos de fertilización, implantación y mantenimiento de la gestación (38). Por ello Pinedo *et al.*, (18) señalan que el tiempo hasta el primer servicio fue 21,8 días más en vacas con al menos un recuento de células somáticas altas (RCS) en comparación con los controles. Las vacas con al menos un RCS altas, antes del primer celo fértil generaron un incremento en el tiempo hasta la concepción de 48,7 días y requirieron en promedio 0,49 servicios más para concebir. Al igual que Abbeloos., (10), menciona que, el RCS al ser igual o superior a 400.000 células en los 30 días posteriores a la inseminación existe una reducción del 20% de probabilidad de preñar una vaca, en animales con menores RCS por debajo de 200.000 cs/ml se halló menor impacto (27).

En una enfermedad como la mastitis, la inflamación daña el epitelio secretor mamario y las células fagocíticas liberan radicales citotóxicos, citoquinas pro-

inflamatorias (TNF- α , IL-1b, IL-6, IL-8), y otras moléculas entre ellas: especies reactivas de oxígeno (ROS) y el óxido nítrico (NO) (figura 1), (33) así también se desencadena la producción de mediadores de la inflamación como las prostaciclinas, tromboxano A y prostaglandinas, incluyendo la PGF 2α que será absorbida por aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos hasta llegar a los ovarios, ejerciendo su efecto en los mismos (39).

La fuente de ROS parece ser células inflamatorias, como macrófagos y neutrófilos, ya que están presentes en el ovario, en la ovulación y producen una cantidad enorme de radicales libres (36), mientras que en la luteólisis las ROS se producen en las células esteroideogénicas y los fagocitos mononucleares en el cuerpo lúteo (33).

Es así como las concentraciones de ROS pueden desempeñar un papel clave tanto en la implantación como en la fertilización de ovocitos y están involucrados en la etiología del desarrollo embrionario defectuoso y parecen ser responsable de numerosos tipos de daño embrionario (37).

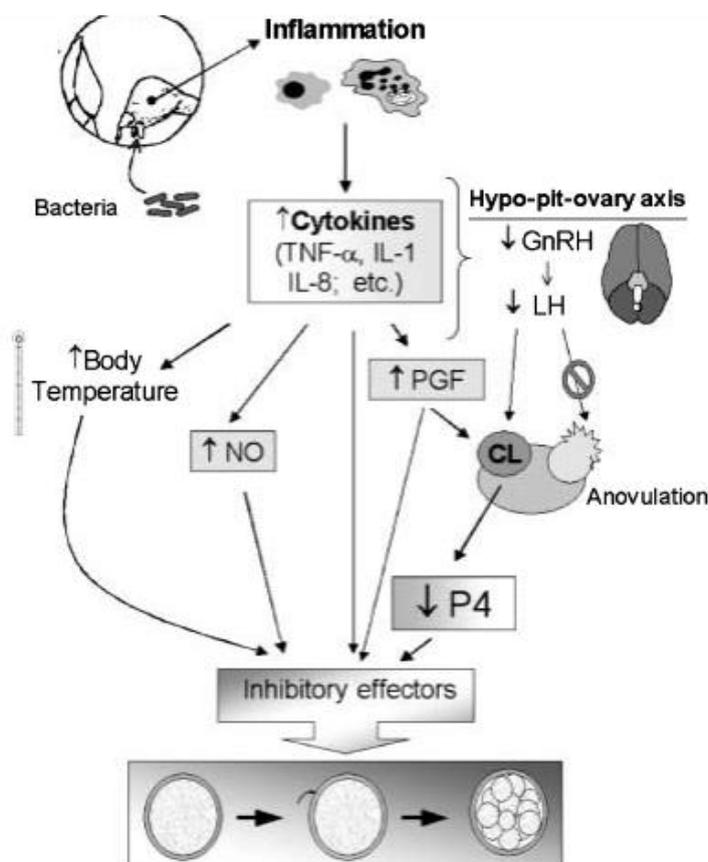


Figura 1. Liberación de Células fagocíticas, citotóxicos, citoquinas pro-inflamatorias mediante el proceso inflamatorio (40).



2.4.1. Efecto de la mastitis en el eje Hipotálamo-hipófisis-ovario

El hipotálamo se encuentra en la base del cerebro y las neuronas del área ventromedial y el área pre óptica del hipotálamo, secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que llega al hipófisis mediante el sistema porta-hipotálamo-hipofisario, y estimula la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH) (41). El papel de la FSH es promover el crecimiento folicular y la producción de estrógenos por los ovarios, mientras que la LH causa la maduración del folículo, ovulación, estimula la formación del cuerpo lúteo y la producción de progesterona (42).

El hipotálamo y la hipófisis son capaces de responder a un aumento sostenido de la secreción de estrógenos mediante el aumento pulsátil de la GnRH, el cual produce la ovulación del folículo, este mecanismo permite al folículo comunicar su estado de madurez a través de la producción de estrógenos que a medida de su maduración aumenta, al contrario, la baja concentración provoca una retro inhibición o Feedback negativo (43). Por lo que una alteración en el eje hipotálamo-hipofisario-ovario-útero producirá señales hormonales anormales y esto provoca un retraso en la reanudación del ciclo ovárico después del parto (44).

En su estudio Kumar *et al.*, (45) menciona que la inhibición de la hormona luteinizante cerca del estro condujo a anovulación, retraso de la ovulación y formación de quistes en vaquillas, estudios indican que citosinas liberadas después de la exposición a endotoxina bloquearon la secreción pulsátil de LH o inhibición de liberación de gonadotropinas, la amplitud de pulso de hormona (GnRH). Por consiguiente, desarrollo folicular insuficiente y maduración de los ovocitos podría conducir a una producción de estrógeno insuficiente y, por lo tanto, a la falta de estro conductual, anovulación y fracaso de la concepción (38). Es así que la disminución del estradiol alrededor del momento de la ovulación disminuye, retrasa o anula el pico de LH y la ovulación, resultando en una disminución de la probabilidad de concepción del 15 - 20% (11).

Las endotoxinas producidas por bacterias Gram positivas o negativas, provocan la producción de cortisol, un inhibidor muy potente del eje hipotálamo-hipofisario

(10). En consecuencia el cortisol, acorta la intensidad del pico de GnRH en el hipotálamo, lo que tiene un efecto inmediato en la intensidad del pico basal de LH de la glándula hipofisaria, inhibiendo el crecimiento del folículo y como consecuencia menores concentraciones de estradiol pre ovulatorio (figura 2) (39).

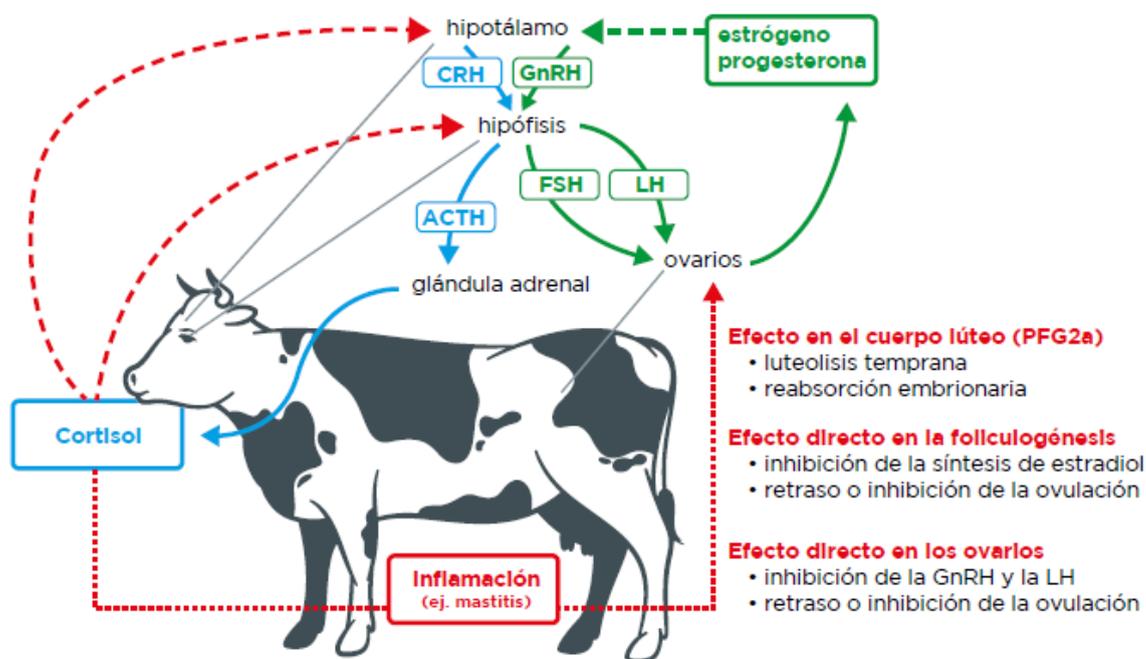


Figura 2 Alteración Eje Hipotálamo- hipófisis –ovarios (39).

La alteración de la función endocrina en las células de la granulosa del folículo se ve afectada por la activación de los mediadores de la inflamación debidos a la infección. Estas células ejercen un papel crucial en el desarrollo folicular mediante la producción de hormonas esteroideas, particularmente el estradiol, el cual juega un papel clave en el desarrollo y maduración del ovocito (39). Dicha maduración nuclear y citoplasmática del ovocito es crucial para que la fertilización ocurra, es sabido que este proceso se ve alterado cuando los ovocitos se ven expuestos a mediadores de la inflamación como las prostaglandinas (6). Observaciones realizadas en estudios experimentales sugirieron que infusiones de endotoxinas de *E. coli* desencadenan una liberación prolongada de prostaglandina F2 α , que lleva a la posterior estimulación de las contracciones del músculo liso del útero y efecto luteolítico, lo cual lleva a una disminución en las concentraciones de progesterona (46).



2.5. Líquido folicular

El ovocito en desarrollo está rodeado por el líquido folicular, que es un traslucido sérico, producido por las células de la teca y granulosa en el antro folicular, esto ocurre durante la fase de crecimiento de los folículos, aumentando la presión dentro del antro (47) y del mismo modo está formado por exudados de suero, ya que las capas celulares circundantes permiten la difusión libre de proteínas de hasta 500 kDa (48). El fluido folicular mantiene un ambiente adecuado para la maduración del ovocito, además de ser un traslucido sérico contiene sustancias producidas localmente que comparten la actividad metabólica de las células foliculares (49), también posee una serie de factores secretados, estudios reportados sugieren la presencia de factores de crecimiento como inhibina, activina, factor insulínico de crecimiento (IGF) (50). Es así que las concentraciones de algunos componentes del líquido folicular varían durante las diferentes etapas del ciclo reproductivo, las estaciones, la temperatura ambiental y el estado nutricional del animal (48). Además se ha informado que el líquido folicular es rico en hormonas reproductivas esteroideas que incluyen testosterona, estradiol y progesterona (P4), por lo que su composición y cantidad pueden modificarse durante el desarrollo del folículo (47).

Los estrógenos son hormonas esteroideas producidas en el folículo ovárico y son los responsables de estimular la conducta sexual o de celo actuando sobre el sistema nervioso central del animal; también tienen acción sobre otros órganos del aparato reproductivo como son las trompas de Falopio, el útero, la vagina y la vulva (51). Así el aumento de la producción de estradiol por los folículos preovulatorios depende de la mayor capacidad de las células internas de la teca para producir androstendiona al igual que la mayor capacidad de las células de la granulosa para convertir la androstendiona en estradiol (52). La concentración variable de esteroideos en el líquido folicular está relacionada con el tamaño, el crecimiento del folículo, la etapa del ciclo del estro y el estado sano de los folículos ováricos (49).

La acumulación de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas en el líquido folicular de animales con procesos inflamatorios puede vincular la infección y la disfunción ovárica, debido a que el folículo carece de células del



sistema inmunológico, es así que los animales con mastitis tienen niveles de estradiol folicular inferiores y una expresión genética de células de la granulosa alteradas, se cree que las células de la granulosa bovina expresan ARNm para el complejo receptor TLR4 desempeñando un papel activo en la protección de ovocitos de mamífero contra PAMs (53).

Las posibles diferencias en los efectos de las bacterias G + y G- y sus toxinas asociadas en las respuestas reproductivas se han expuesto en estudios como los de Furman et al., (54) donde el tratamiento con G - indujo una disminución inmediata en las concentraciones foliculares de estradiol y androstenediona, 7 h después de la administración de toxina, mientras que el tratamiento con G + indujo disminuciones tanto inmediatas como a largo plazo en los esteroides foliculares, esta última detectada semanas después de la administración de la toxina.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1. Físicos

- Tubos Vacutainer
- Ecógrafo
- Equipo para OPU
- Cooler
- Tubos de colección
- Ekomilk Biomatic Cells Analyzer scan

3.1.2. Biológicos

- Vacas
- Leche
- Sangre
- Líquido folicular

3.1.3. Químicos

- Alcohol
- PGF2 α Dinoprost 25 mg (Lutalyse)
- Benzoato de estradiol 2 mg (Grafoléon)
- DIB
- Yodo
- Lidocaína
- Xilacina 2%.
- Electroquimioluminiscencia (EQL)

3.2. Métodos:

La investigación contempla tres ensayos, en los cuales se estableció el efecto de la mastitis subclínica sobre la fertilidad, característica de folículo preovulatorio y los niveles de estrógenos en sangre y líquido folicular.

3.2.1. Área de estudio

La presente investigación se llevó a cabo en los cantones de Cuenca, Girón, San Fernando de la provincia del Azuay y Déleg en la provincia del Cañar (figura 2),

con una altitud que oscila entre 2.560 – 2.950 msnm. Poseen un clima templado debido a la altura y la presencia de la cordillera de los Andes, su Temperatura varía entre 10 - 20 °C.



Figura 3. *División Político Administrativa del Ecuador, Señaladas las provincias de Azuay y Cañar (52).*

3.2.2. Unidades de estudio

Esta investigación se desarrolló en vacas de raza Holstein sin registro, pertenecientes a 30 ganaderías que se encontraban monitoreadas mensualmente por el proyecto de “Sostenibilidad de los Sistemas de Producción Láctea” (SSPL). Los hatos seleccionados realizaban inseminación artificial y contaban con registros productivos, reproductivos y sanitarios.

3.2.2.1. Criterios de inclusión

Las vacas valoradas en el presente estudio fueron exclusivamente de genotipo Holstein sin registro, múltiparas (2-5 partos), condición corporal (C.C) entre 2,75 - 3,5 en la escala de 1 a 5, que se encontraban dentro del primer tercio de lactancia, y no presentaban patologías adicionales.

3.2.2.2. Criterios de exclusión

Vacas que no respondieron al protocolo de sincronización o fueron descartados durante el ensayo.



3.2.3. Diseño experimental

En la presente investigación se realizaron 3 ensayos por separado:

3.2.4. Ensayo 1

Este experimento fue descriptivo, longitudinal retrospectivo, en el cual se evaluó el efecto de la mastitis subclínica sobre el porcentaje de preñez resultado de la primera inseminación pos diagnóstico de la enfermedad.

El ensayo contempló dos grupos:

- **T1:** Vacas sanas: **n=60**
- **T2:** Vacas con mastitis subclínicas: **n=60**

Metodología

Determinación de mastitis subclínica

Toma de muestras de leche:

- Se visitó las ganaderías en el ordeño de la mañana.
- Se tomó una muestra de leche de cada vaca (50 ml), en un frasco estéril, luego se etiquetó correctamente y procedió a llenar la hoja de campo del **Anexo 1**.
- Las muestras fueron transportadas en un cooler con gel refrigerante a (4°C) hacia el laboratorio de lactología de la Universidad de Cuenca para su análisis.

Recuento de células somáticas (RCS):

El RCS se realizó a través del equipo Ekomilk Biomatic Cells Analyzer Scan de forma individualizada, para lo cual se realizó:

- Una vez en el laboratorio las muestras de leche fueron atemperadas en baño María a 25°C al igual que el surfactante Ekoprim, hasta alcanzar dicha temperatura.
- En el matraz de muestreo del Ekomilk se colocó 10 ml de leche más 5 ml de surfactante Ekoprim.
- Y se esperó el resultado emitido por el equipo (cs/ml).

Las vacas con más 200.000 cs/ml fueron consideradas dentro del T2 y aquellas con menos de 200.000 cs/ml en T1. En estos dos grupos, los animales que fueron inseminados dentro de los 30 días subsiguientes al muestreo se incluyeron definitivamente en T1 y T2 y el resto fueron descartadas.



Determinación de preñez:

Luego de 60 días la determinación de preñez fue realizada por el técnico del proyecto y se transcribió la información en los registros reproductivos de cada uno de los animales en estudio con la finalidad de establecer si quedaron o no gestantes, fruto de la inseminación efectuada dentro de los 30 días pos diagnóstico de MSC.

3.2.5. Ensayo 2

Fue prospectivo descriptivo, buscó valorar el tamaño del folículo preovulatorio y el porcentaje de ovulación, luego de una sincronización pos diagnóstico de mastitis subclínica (MSC). (Anexo 4). Contó con dos tratamientos: 40 vacas sanas (T1) y 40 vacas con MSC (T2).

Valoración de MSC

Para la determinación de MSC se utilizó el mismo procedimiento detallado en el ensayo 1. Una vez organizadas las vacas en T1 y T2 se procedió a realizar un protocolo convencional de IATF, que se detalla a continuación:

- **Día 0:** Implante DIB + Benzoato de estradiol (2 mg)
- **Día 7:** Retiro del implante + PGF₂ α (25mg)
- **Día 8:** Benzoato de estradiol (1 mg)
- **Día 10:** 54 – 56 horas posretiro del implante se evaluó el tamaño del folículo preovulatorio
- **Día 12:** valoración del porcentaje de ovulación

Valoración del FPO:

54 – 56 h posretiro del implante se realizó la evaluación del tamaño del FPO, con un ecógrafo Aloka ProSound 2, multifrecuencia, provisto de un transductor lineal 7,5 MHz, usando la técnica de barrido en ubicación latero-medial, dorsoventral y cráneo-caudal, en cada ovario. Una vez localizado el FPO se determinó el diámetro mediante el promedio de las medidas, longitudinal y una transversal del mismo.

Determinación del porcentaje de ovulación:



La ovulación fue verificada 48 horas posteriores al día de la valoración del FPO (día 10). Para la evaluación se utilizó un ecógrafo Aloka ProSound 2, multifrecuencia, provisto de un transductor lineal 7,5 MHz y se llenó el **Anexo 5**.

3.2.6. El ensayo 3

Determinó la relación entre los niveles de estrógenos en sangre y en el líquido folicular, en vacas sanas (n=10) y con mastitis subclínica (n=10). (Anexo 6). El estudio tuvo una connotación descriptiva.

Valoración de MSC: se aplicó la técnica utilizada y descrita en el ensayo.

Valoración de estradiol sangre:

- Se obtuvo una muestra de sangre mediante punción de la vena yugular (10 ml), con tubos Vacutainer™ heparinizados y agujas 18-G específicas para estos tubos.
- Inmediatamente la muestra fue centrifugada a 2.500 rpm, durante 15 minutos.
- El sobrenadante (2ml) fue colocado en un vial para su congelación hasta su análisis con quimioluminiscencia.

Valoración de estradiol en líquido folicular

Para obtener la muestra de líquido folicular se realizó la técnica de OPU, por un único técnico debidamente capacitado

- Se realizó asepsia y antisepsia del animal
- Luego se procedió a realizar el vaciado de las heces del recto
- La vaca fue bloqueada con 5 ml de Roxicaina más 0,04 ml Xilacina vía epidural
- Se utilizó el equipo de aspiración ecoguiada con la finalidad de obtener líquido folicular
- El líquido fue centrifugado a 2.500 rpm, durante 15 minutos, posteriormente se tomó el sobrenadante en un vial para su congelación hasta su análisis.



3.3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los tres ensayos fueron ingresados en el programa Excel, en donde fueron tabulados y posteriormente analizados en el programa SPSS versión® 25.

Se determinó la normalidad de los datos con la prueba Kolmogorov-Smirnov. Las variables cuantitativas que mostraron normalidad en sus datos fueron valoradas con la prueba T de Student y las que no poseían normalidad con Mann-Whitney. La relación entre variables cualitativas fue estimada la prueba Chi-cuadrado.



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados del objetivo 1

4.1.1. Porcentaje de preñez

Al determinar el porcentaje de preñez de los dos tratamientos en estudio (**T1**: vacas sanas y **T2**: vacas enfermas), se encontró diferencias significativas ($P < 0,05$) con valores expresados de 68,3% y 48,3% respectivamente (figura 3). Porcentajes similares a los informados por **Villa et al.**, (56) quienes establecieron que, el efecto de la mastitis subclínica en vacas Holstein y Normando en cualquier momento después del parto, presentaron porcentajes de concepción más bajo en comparación con las vacas no infectadas. **Pinedo et al.**, (57) de igual forma concuerda con lo reportado al indicar que la mastitis subclínica, medida por un recuento de células somáticas lineales altas $\geq 4,5$ tuvo un impacto significativo en el rendimiento reproductivo en el ganado lechero chileno, manifestado por un aumento de días entre el parto-primer servicio, intervalo parto-concepción y número de servicios por concepción, esto es corroborado por **Pineda**, (58) que en su estudio relaciona el RCS y la tasa de concepción, observando que el 47,42% de vacas con < 200.000 CS/ml gestaron en mayor proporción, mientras que los animales con hasta 400.000 cs/ml presentan un porcentaje de preñez más bajo (38,88%), las vacas que presentaron valores mayores a > 400.00 CS/ml obtuvieron un 10,75% lo que indica una diferencia estadísticamente significativa.

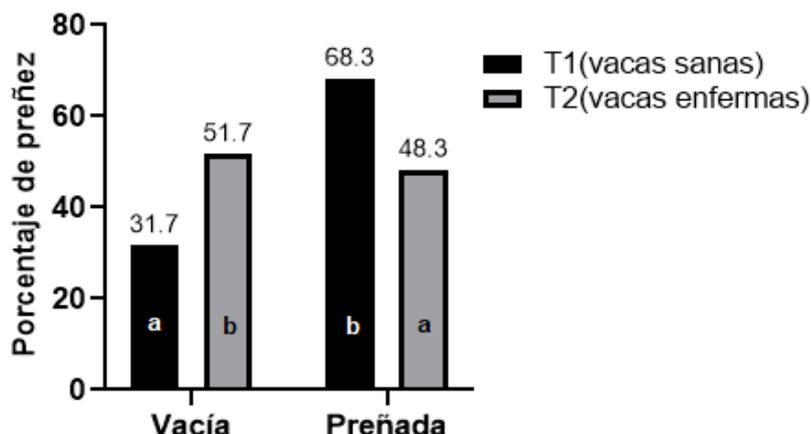


Figura 4. Porcentaje de vacas preñadas y vacías en los dos tratamientos (T1=vacas sanas; T2= vacas enfermas). Prueba de Chi Cuadrado ($P < 0,05$).
Fuente: autoras

4.2. Resultados del objetivo 2

4.2.1 Actividad ovárica

El estudio permitió determinar que los dos ovarios izquierdo y derecho tienen porcentajes similares de actividad ($P > 0,05$) (figura 5). Autores como **Karamishabankareh et al.**, (59) contrasta con estos resultados, ya que en su estudio realizado en vacas Holstein Friesian, determinan que el ovario derecho es activo en un 60,9% frente a 39,1%, del izquierdo, al igual que **Loste.**, (60) indica en su estudio, que hubo más gestaciones en el cuerno derecho (53,98 %) que en el izquierdo (46,02 %), y al estudiar el sex ratio índico que en el cuerno derecho se gestaron más machos (58,26 %) y en el izquierdo más hembras (54,09 %) esto en vacas de raza Holstein, por su parte **Tous et al.**, (61) mencionan que la frecuencia de gestación en el cuerno derecho fue de (63,6%) mayor que el izquierdo (34,4%) en el ganado cebú cruzado (*Bos indicus x Bos taurus*) del trópico bajo colombiano.

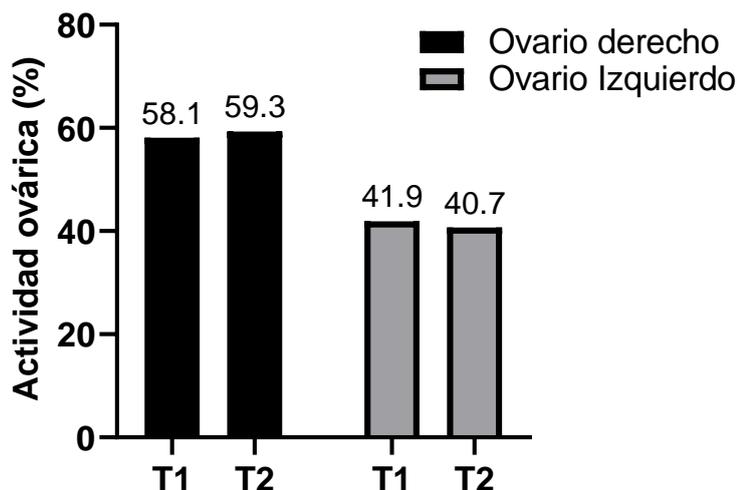


Figura 5. Relación de actividad de ovario derecho e izquierdo en cada uno de los tratamientos. Prueba de Chi cuadrado ($P>0,05$).

Fuente: autoras

4.2.2. Valoración el tamaño del folículo preovulatorio

El tamaño del folículo preovulatorio de los dos tratamientos en estudio (T1 y T2) demostraron valores ($P>0,05$) similares (11,9 y 13,6 mm respectivamente) entre ellos; Sin embargo, es importante resaltar que se muestra una tendencia de $P=0,07$, entre los dos tratamientos, (figura 6). Estos diámetros son menores a los obtenidos por **Colazo et al.**, (62) donde el tamaño del folículo preovulatorio en vacas Holstein sometidas a protocolos de IATF, tuvieron una media de $16,4 \pm 0,1$ mm, con un rango de 11–25 mm, resultados semejantes obtuvo **Monroy.**, (63) al describir que en vacas Holstein el promedio de diámetro del folículo preovulatorio es de $17,85 \pm 2,39$ mm las mismas que poseían mayor probabilidad de gestación. La no existencia de diferencia entre los tamaños de los FPO del T1 y T2 de la presente investigación concuerdan con los obtenidos por **Lavon et al.**, (7) quienes establecieron que, el diámetro de los folículos preovulatorios en vacas que experimentan mastitis subclínica o un evento de mastitis clínica aguda, fueron similares entre los grupos en estudio. También valores similares fueron determinados por **Hockett et al.**, (64) en vacas con mastitis inducida por *Streptococcus uberis* y su grupo control. Además, **Furman et al.**, (54) mencionaron que, las tasas de crecimiento y los tamaños de los

folículos preovulatorios en los días 2, 4 y 6 del ciclo estral, de los animales que fueron inducidos a presentar mastitis subclínicas antes, al final y 16 días después de la ovulación, no difirieron entre los ciclos o los grupos experimentales. Del mismo modo **Santos et al.**, (65) rechazó parcialmente que la mastitis subclínica en vacas mestizas (*Bos taurus* - Holstein x *Bos indicus* - Gir) pudiese comprometer el crecimiento folicular, ya que no se detectaron diferencias entre los tratamientos; tanto en el folículo dominante como en la tasa de crecimiento ovulatorio; sin embargo, la tasa de ovulación fue menor en vacas con mastitis.

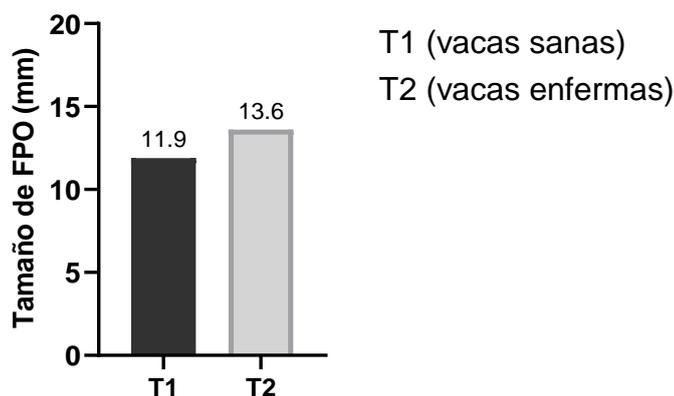


Figura 6. Media del Tamaño de folículo preovulatorio en cada tratamiento. Prueba de Mann-Whitney ($P > 0,05$) con valor de tendencia ($P = 0,07$).

Fuente: autoras

4.2.3. Porcentaje de ovulación

Se estableció que el porcentaje de ovulación de los dos tratamientos en estudio (T1 y T2) mostraron valores similares 93.5 y 85.2% ($P > 0,05$) (figura 7). En este contexto, **Lavon et al.**, (19) coinciden con estos porcentajes, al sugerir que los efectos perturbadores de la mastitis clínica o subclínica en el intervalo estro-ovulación, no fueron alterados en el 70% de las vacas mastíticas en estudio. Sin embargo, hay autores como **Kumar et al.**, (66) quienes describieron que la reducción en la liberación pulsátil de la LH influye en la interrupción del soporte de gonadotropina para la función folicular; Secreción preovulatoria de estradiol, que posteriormente reduce la expresión del estro; secreción de LH; oleada de LH preovulatoria; y la ovulación. Por su parte **Lavon et al.**, (67) informaron que la oleada de LH se retrasó en las vacas expuestas al lipopolisacárido (LPS) durante el estro, lo que dio lugar a una ovulación retrasada (intervalo de

ovulación entre el estro retrasado de 30 a 75 h), lo que finalmente redujo las posibilidades de una fertilización exitosa.

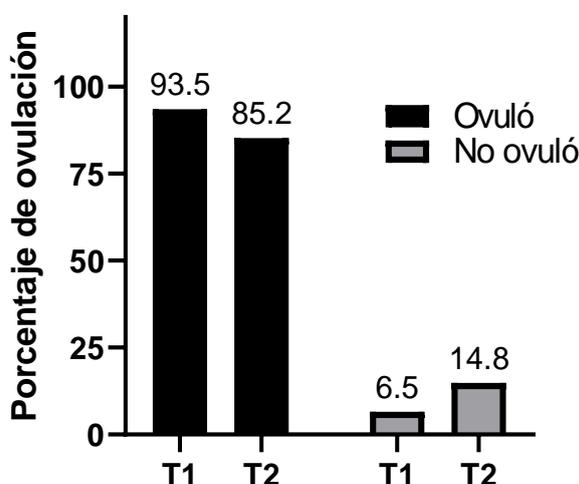


Figura 7. Porcentaje de ovulación en cada tratamiento. Prueba Chi Cuadrado ($P > 0,05$)

Fuente: autoras

4.3 Resultados del objetivo 3

4.3.1. Valores de estrógeno (E 2) en suero sanguíneo

Se determinó que el valor de Estrógenos presentes en suero sanguíneo de los tratamientos T1 y T2 presentan diferencia estadística ($P < 0,05$) (figura 8), con valores de 37,4 y 73,9 pg/ml respectivamente, esta diferencia concuerda con la obtenida por **Musal et al.**, (68) en donde señala que las concentraciones séricas de estradiol (pg/mL) en vacas con infección subclínica fueron más altas que el grupo de control en 24h (63.85 ± 7.65 y 44.2 ± 1.94); 36h (60.95 ± 7.1 y 45.89 ± 3.59) y 48h (59.94 ± 8.19 y 41.4 ± 2.39 , respectivamente), sin embargo estos valores se encuentran en un rango referencial reportado por **Moyano et al.**, (69) en su estudio en donde señala un rango entre 0,5 a 120 pg/ml para vacas Holstein.

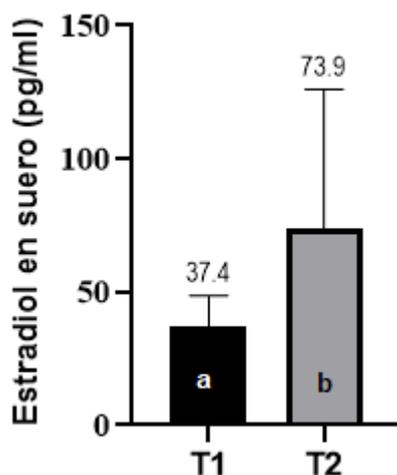


Figura 8. Valores de estrógenos presentes en suero sanguíneo. Prueba T de Student ($P < 0,05$)

Fuente: autoras

4.3.2. Valores de estrógeno (E_2) en líquido folicular

Se evidenció que el valor de estrógenos presentes en líquido folicular de los dos tratamientos en estudio (T1 y T2) si bien no presentó diferencia estadística ($P > 0,05$) describe una tendencia ($P = 0,07$), con valores de 4.086,6 y 5.140,1 pg/ml respectivamente (figura 9). Al igual que **Opara et al.**, (70) quienes obtuvieron concentraciones de 2558.8 ± 8.9 pg / mL para el estrógeno en líquido folicular de vacas cíclicas, estos valores obtenidos difieren a los que **Lavon**, (7), señala en su estudio, en donde un tercio de las vacas con MSC poseen valores de 400.000 pg/ml y los dos tercios restantes exhibieron niveles normales de estradiol (> 400.000 pg/ml). **Furman et al.**, (54) también coinciden que la infección intramamaria subclínica inducida por toxinas Gram + y Gram - causó una disminución prolongada y marcada en el estradiol folicular, incluso días después de terminada la inducción de la mastitis

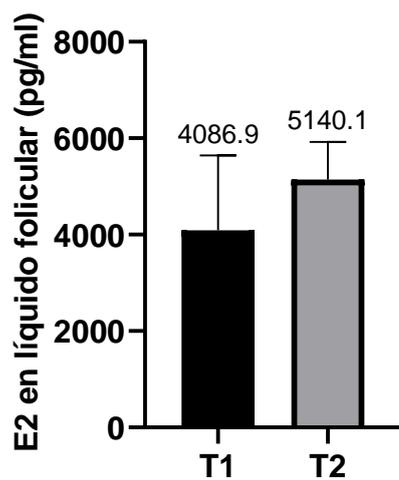


Figura 9. Valores de estrógenos presentes en líquido folicular. Prueba T de student ($P>0,05$)

Fuente: autoras



5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, bajo las condiciones del presente estudio podemos concluir que:

- Las vacas que adquieren mastitis subclínica ven afectada su porcentaje de preñez, posterior al proceso patológico.
- La mastitis subclínica se correlaciona negativamente con el diámetro de folículo preovulatorio, más no así en su actividad ovárica.
- Las concentraciones de estrógenos en vacas diagnosticadas con mastitis subclínica son inferiores en suero sanguíneo, mas no en liquido folicular.



6. RECOMENDACIONES

- Debido al impacto negativo que tiene la mastitis en la producción y sobre todo en la reproducción se recomienda realizar periódicamente análisis para el diagnóstico de la misma y definir el tipo de agente etiológico.
- Se sugiere incluir mayor cantidad de animales a estas investigaciones para evitar tendencias y verificar si hay o no significancia estadística en los resultados. Se exhorta a realizar más investigaciones de tipo experimental, evaluando el desarrollo y calidad del ovocito fecundado de vacas mastíticas *in vitro* para conocer más a fondo el efecto de la mastitis subclínica.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández Bolaños O F, Trujillo Graffe E, Peña Cabrera J, Cerquera Gallego. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista Veterinaria REDVET*. 2012; 13(11).
2. Mungube EO, Tenhagen BA, Regassa F, Kyule MN, Shiferaw Y, Kassa T, *et al*. Reduced Milk Production in Udder Quarters with Subclinical Mastitis and Associated Economic Losses in Crossbred Dairy Cows in Ethiopia. *Tropical Animal Health and Production*. 2005 Noviembre; 37(11).
3. Hudson C. La relación entre mastitis-fertilidad. Posibles factores de confusión. *Boehringer Ingelheim*. 2014
4. Gebreyohannes Y, Fekadu Gudeta B. Milk yield and associated economic losses in quarters with subclinical mastitis due to *Staphylococcus aureus* in Ethiopian crossbred dairy cows. *Trop Anim Health Prod*. 2010 Enero; 42(1).
5. Córdova-Izquierdo A, Iglesias Reyes AE, Ruiz Lang CG, Guerra Liera JE, Inzunza Castro JF, Villa Mancera EA, Méndez Mendoza M, Huerta Crispín R, Juárez Mosqueda ML. Mastitis stress and reproduction in cows. *International Journal of Current Research*. 2016 April; 8 (04).
6. Cook J. Impacto de la mastitis sobre la producción de leche y la tasa de preñez.. *Boehringer Ingelheim*. 2012;1.
7. Lavon Y, Leitnerb G, Klipperra E, Moallemc U. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domestic Animal Endocrinology*. 2011 Enero; 40(1).
8. Córdova Izquierdo , Córdova Jiménez CA, Córdova Jiménez MS, Saltijeral Oaxaca. Efecto de la mastitis y el estrés sobre la reproducción de la vaca. *Revista. Veterinaria*. 2008; 19(2).
9. Wolfenson D L, Lavon Y. The disruptive effects of mastitis on reproduction and fertility in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*. 2015 Abril; 14(4).
10. Abbeloos E. Mastitis y baja Fertilidad. Mecanismos que explican esta relación. *Boehringer Ingelheim*. 2010 Enero ; 1(4).
11. Heuwieser W. Impacto de la mastitis sobre la producción de leche y la tasa de preñez. *Boehringer Ingelheim*. 2012;(2).



12. Schrick F H , Saxton A , Dowlen O. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *American Dairy Science Association*. 2001 January ; 84.
13. Acosta Moreno A, Mira Hernández J, Posada Arias S. Tópicos en mastitis bovina: desde la etiología hasta algunas terapias alternativas. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*. 2017 Enero - Junio; 6(1).
14. Malinowski E, Smulski S, Markiewicz H, Kaczmar M. The effect of some drugs injection to pregnant heifers on blood antioxidant status. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2004; 7(2).
15. Hertl JA, Gröhn YT, Leach JDG, Bar D, Bennett GJ, González RN, *et al*. Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York State Holstein dairy cows. *American Dairy Science Association*. 2010 Diciembre ; 93.
16. Ramírez Gaviria G, Arroyave Sierra B. Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias Rev Col Cienc Pec*. 2001; 14(1).
17. Calderón A, Rodríguez C. Prevalence of bovine mastitis and its infectious etiology in specialized milk production systems at cundiboyacense plane (Colombia).. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias Rev Col Cienc Pec*. 2008 noviembre; 21.
18. Pinedo PJ, Melendez , Villagomez- JA. Effect of high somatic cell counts on reproductive performance of Chilean dairy cattle. *American Dairy Science Association*. 2009 Noviembre; 92.
19. Lavon Y, Leitner G, Voet H, Wolfenson D. Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation,steroid and gonadotrophic hormone concentrations,and follicular and luteal growth in cows. *American Dairy Science Association*. 2010 Marzo; 93(3).
20. Scaramelli A, González Z. Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. *Manual de Ganadería Doble Propósito*. 2005 Enero; 1(1).
21. Alvarez Pogyo EA, Chuqui Murillo CA. “Prevalencia de mastitis subclínica mediante California Mastitis Test (CMT) en ganado bovino lechero del cantón



- Cuenca". 2017. Tesis previa a la obtención del título de: Médico Veterinario Zootecnista. Universidad de Cuenca.
22. Mellenberger , Roth CJ. Hoja de Información de la Prueba de Mastitis California (CMT). 2000. Hoja de información Depto. de Ciencia Animal, Universidad del Estado de Michigan y Depto. de Ciencia Lechera, Universidad de Wisconsin-Mádison.
23. Wolter Castañeda VH, Kloppert B, Zschoeck. La mastitis bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. *Universidad de Guadalajara*. 2010 enero; 1(1).
24. Hernández Reyes M, Bedolla Cedeño JL. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *REDVET*. 2008; 1(9).
25. Corbellini CN. La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. 2004. Proyecto Lechero, *E.E.A. INTA*.
26. Vásquez Juan F, Loaiza Erica T, Olivera Martha. Calidad higiénica y sanitaria de leche cruda acopiada en diferentes regiones colombianas. *Universidad de los Llanos- ORINOQUIA*. 2012; Vol. 16 (2).
27. Echeverri Zuluaga J, Jaramillo MG, Restrepo Betancur F. Evaluación comparativa de dos metodologías de diagnóstico de mastitis en un hato lechero del Departamento de Antioquia. *Revista Lasallista de Investigación*. 2010; 7(1).
28. Nickerson SC. Mammary Resistance Mechanisms | *Anatomical. Elsevier Ltd*. 2011 Febrero; 3(2).
29. Sordillo. Factores que afectan a la inmunidad glándula mamaria y la susceptibilidad de la mastitis. *Ganadería Ciencia Producción*. 2005; 98.
30. Burvenich C, Bannerman D, Lippolis JD, Peelman L, Nonnecke BJ, Kehrl Jr. ME, *et al*. Cumulative Physiological Events Influence the Inflammatory Response of the Bovine Udder to Escherichia coli Infections During the Transition Period. © *American Dairy Science Association*. 2007; 99.
31. Pyolara S. Mastitis in Post-Partum Dairy Cows. *Reprod Dom Anim*. 2008; 43 (2).
32. Malinowski E. The use of some immunomodulators and non-antibiotic drugs in a prophylaxis and treatment of mastitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2002; 5.



33. Celi P. The role of oxidative stress in small ruminants' health and production. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2010; 39.
34. Malinowski E, Smulski , Markiewicz , Kaczmar M. The effect of some drugs injection to pregnant heifers on blood antioxidant status. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2004; 7(2).
35. Lopez H. La Mastitis, Enemiga del Exito Reproductivo. *Hoard's Dairyman*. 2010 Noviembre.
36. óżwik A, Krzyżewski , Strzałkows , Poławska , Bagnicka , Wierzbi A. Relations between the oxidative status, mastitis,milk quality and disorders of reproductive functions in dairy cows - a review. *Animal Science Papers and Reports*. 2012; 30 (4).
37. Fujii , Luchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Biology and Endocrinology*. 2005 September ; 3(43).
38. Moreira da Silva F, Marques A, Chaveiro A. Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction. *The Open Veterinary Science Journal*. 2010; 4.
- 39 Fujii Luchi Y, Okada F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Biology and Endocrinology*. 2005 September ; 3(43).
40. Lopez H. La Mastitis, Enemiga del Exito Reproductivo. *Hoard's Dairyman*. 2010 Noviembre.
41. Abbeloos E. Mastitis y baja fertilidad. Mecanismos que explican esta relación. *Boehringer Ingelheim*. 2014 Enero; 4.
- 42.Hansen P, Soto P, Natzke R. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. *Am J Reprod Immunol*. 2004 ; 51(4).
- 43.Hernandez Cerón J. *Fisiología Clínica de la reproducción de Bovinos Lecheros*. 1st ed. Julia LM, editor. Mexico D.F; 2012.
44. Bearden HJ, Fuquay JW. Procesos Naturales de Sincronización. In *Reproduccion Animal Aplicada*. Mexico D.F: *El Manual Moderno S.A*; 1982. p. 41-42.



45. Cunningham JG, Klein BG. Reproducción y Lactación. In Davidson AP, Stabenfeldt GH. Fisiología Veterinaria. Barcelona: *Elsevier*; 2009. p. 470-471.
46. Abbeloos E. El comportamiento del animal con mastitis afecta a su fertilidad. *Boehringer Ingelheim*. 2014; 5.
47. Heuwieser W. Impacto de la Mastitis sobre la producción de leche y la tasa de preñez. *Valley Agricultural Software*. 2014 enero; 1(1).
48. Kumar N, Manimaran A, Kumaresan A, Jeyakumar S, Sreela L. Mastitis effects on reproductive performance in dairy cattle: a review. *Trop Anim Health Prod*. 2017 Febrero.
49. Guerreiro TM, Fernandes Gonçalves , O. Rodrigues CF, Noin de Oliveira , de Oliveira Lima , Visintin JA, *et al*. A Metabolomic Overview of Follicular Fluid in Cows. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018 Febrero; 5(10).
47. Tripathi S, Farman , Nandi S, Girish Kumar V, Gupta P. Biochemical Constituents of Ovarian Follicular Fluid in Ruminants and their Significance in Follicle and Oocyte Development. *Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis*. 2015; 4(3).
48. Moradi Kor N. The effect of corpus luteum on hormonal composition of follicular fluid from different sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2014 Agosto; 7(1).
49. Tovío Luna N, Duica Amaya A. Factores relacionados con la dinámica folicular en la hembra bovina. *Spei Domus*.. 2012 Mar; 8(17).
48. Rippe ,CA. El ciclo estral. *Dairy Cattle Reproduction*. 2015. Marzo; 1(1)
49. Perry GA, Swanson OL, Larimore EL, Perry BL, Djira GD, Cushman RA. "Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domestic Animal Endocrinology*. 2014; 48.
50. Bromfield JJ, Sheldon IM. Lipopolysaccharide Initiates Inflammation in Bovine Granulosa Cells via the TLR4 Pathway and Perturbs Oocyte Meiotic Progression in Vitro. *Endocrinology*. 2011; 152(12).
51. Furmana , Leitner G, Rotha , Jacoby S, Wolfenson. Experimental model of toxin-induced subclinical mastitis and its effect on disruption of follicular function in cows. *Theriogenology*. 2014; 08(002).



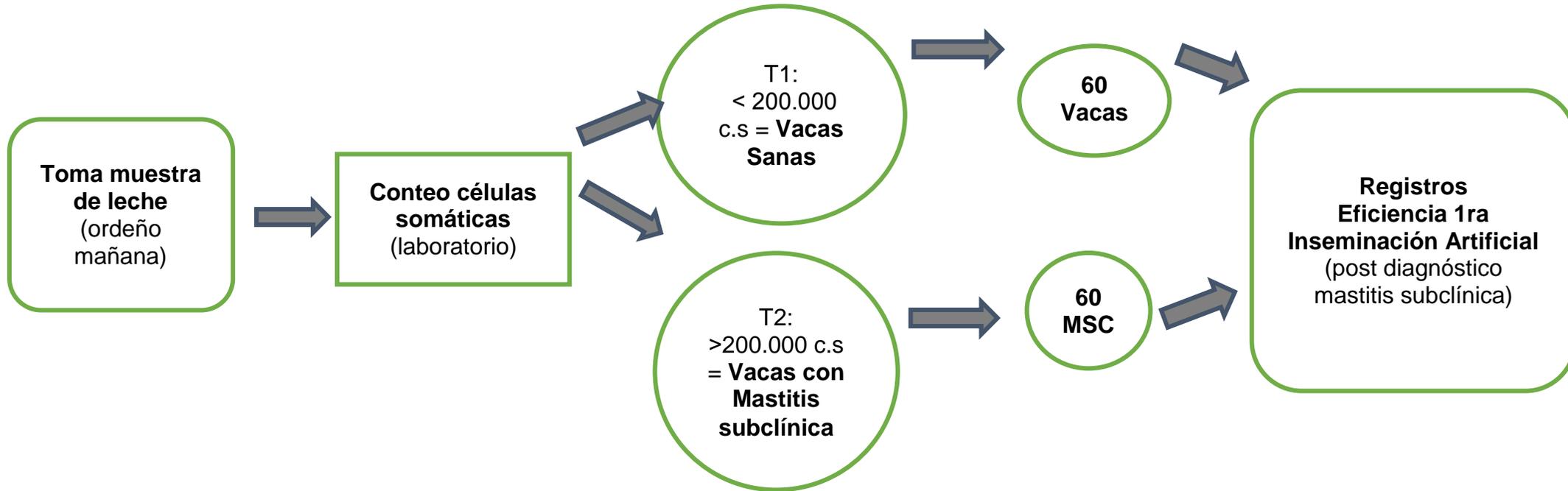
52. Censos INEC. Instituto Nacional de Estadística y Censos. [Online].; 2015 [cited 2019 05 03. Available from: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec>.
53. Villa A , Sanchez J, Ratto , Rodriguez Lecompte JC, Duque M , Sanchez Arias , *et al*. The association between subclinical mastitis around calving and reproductive performance in dairy cows in Colombia. *Animal Reproduction Science*. 2017; 08(10).
54. Pinedo PJ, Melendez , Villagomez JA, Risco CA. Effect of high somatic cell counts on reproductive performance of Chilean dairy cattle. © *American Dairy Science Association*. 2009; 92.
55. Pineda R. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. [Online].; 2017 [cited 2019 Junio 02. Available from: http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42235/R_A%C3%9AL%20PINEDA%20MEJ%C3%8DA.pdf?sequence=1.
56. Karamishabankareh , Hajarian , Shahsavari , Moradinejad R. In vivo and in vitro study of the function of the left and right bovine ovaries. *Theriogenology*. 2015; 1(8).
57. Loste Montoya JM. Universidad de Zaragoza. [Online].; 2016 [cited 2019 Junio 07. Available from: <https://www.anembe.com/wp-content/uploads/PhD-Juan-Manuel-Loste-Montoya.pdf>.
58. González Tous , Pastrana Puche , BarónPinedo , Vertel Morrison. Frecuencia de presentación de gestación con relación al cuerno uterino en bovinos del trópico colombiano. *Rev Med Vet*. 2014; 28.
59. Colazo , Behrouzi , Ambrose , Mapletoft. Diameter of the ovulatory follicle at timed artificial insemination as a predictor of pregnancy status in lactating dairy cows subjected to GnRH-based protocols. *Theriogenology*. 2015; 84.
60. Monroy González MY. Universidad Nacional de Colombia. [Online].; 2017 [cited 2019 junio. Available from: http://www.bdigital.unal.edu.co/59829/1/Tesis_Yulieth_Monroy_G.pdf.
59. Hockett ME, Almeida RA, Rohrbach NR, Dowlen HH, Schrick FN. Effects of Induced Clinical Mastitis During Preovulation on Endocrine and Follicular Function. *J. Dairy Sci*. 2005; 88.



60. Santos G, Bottino MP, Santos , Sim , Souza , Ferreira , *et al.* Subclinical mastitis interferes with ovulation, oocyte and granulosa cell quality in dairy cows. *Theriogenology*. 2018; 04(28).
61. Kumar N, Manimaran , Kumaresan , Jeyakumar S, Sreela , Mooventhan P, *et al.* Mastitis effects on reproductive performance in dairy cattle: a review. *Springer Science*. 2017; 4(17).
61. Lavon , Leitner , Goshen , Braw-Tal , Jacoby S, Wolfenson. Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology*. 2008; 70.
64. Musal T, Beceriklisoy Hb, Peker C, Uçar Eh. Effects of Subclinical Mastitis on Serum Estradiol and Tumour Necrosis Factor Alpha Levels During Estrus in Dairy Cows. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2016 Abril; 22(5).
65. Moyano Bautista MA, Rodríguez CE. Suplementación energética y su efecto en el nivel de colesterol y el perfil hormonal preovulatorio en vacas. *Rev. Salud Anim*. 2014; 36(2).
66. Opara MN, Okoli CI, Herbert, Adeyemo. Ovarian morphology and estradiol-17 β concentrations in serum and follicular fluid of slaughtered zebu cattle in Ibadan, Nigeria. *VETERINARSKI*. 2006; 76(5).
67. Santos ,J.E.P., Cerri , R.L.A., Ballou, M.A., Higginbotham, G.E. , Kirk, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Animal Reproduction Science*. 2004 Mayo; 80 (31–45).
68. Hernandez MV. *Endocrinología Fisiologica General*. Primera ed. Ecuador. UCD, editor. Quito: Editorial Universitaria ; 1994.
69. Fidel Ovidio Castro, Pedro P. Rojas, Lleretny Rodríguez. Nuevas aproximaciones biotecnológicas para combatir la mastitis. *Agro-Ciencia* 6. 2006 Junio; 22(1).
70. Lavona Y, Leitnerb G, Klipperra , Moallemc. Subclinical, chronic intramammary infection lowers steroid concentrations and gene expression in bovine preovulatory follicles. *Domestic Animal Endocrinology*. 2011 Enero; 40(1).

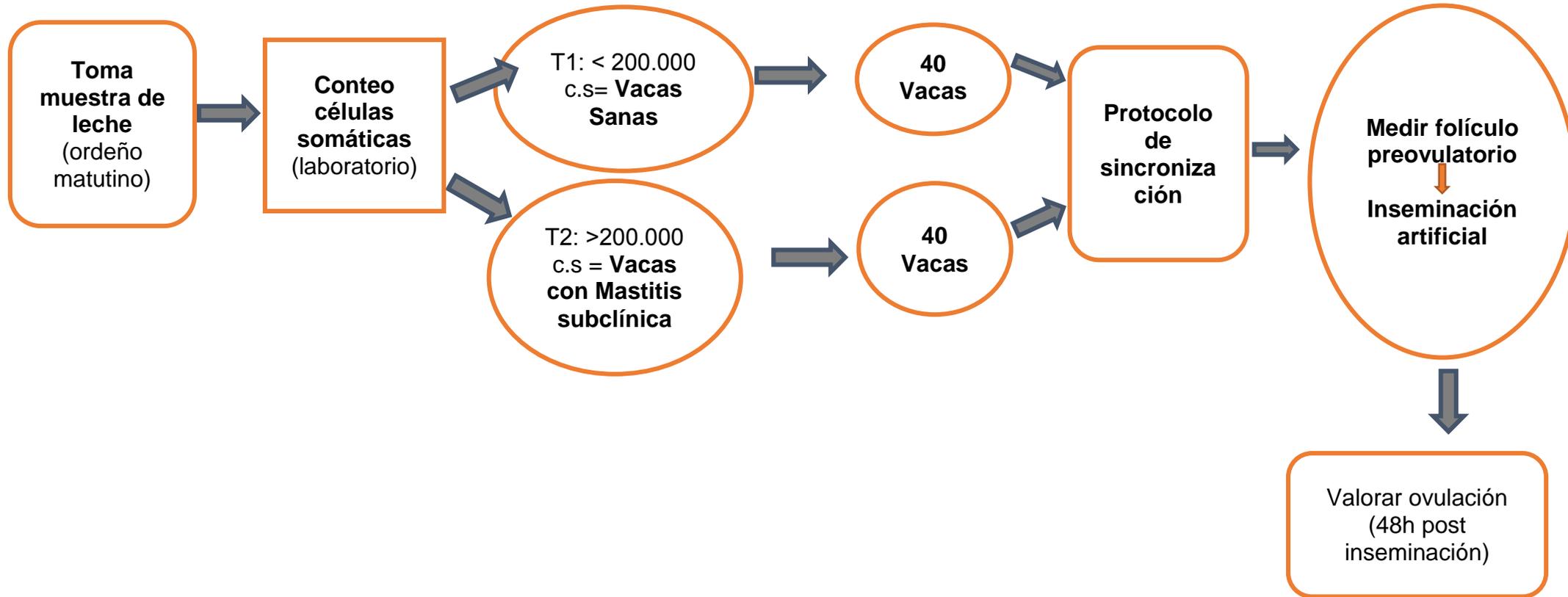


Anexo 2. Flujo grama de la metodología del ensayo 1



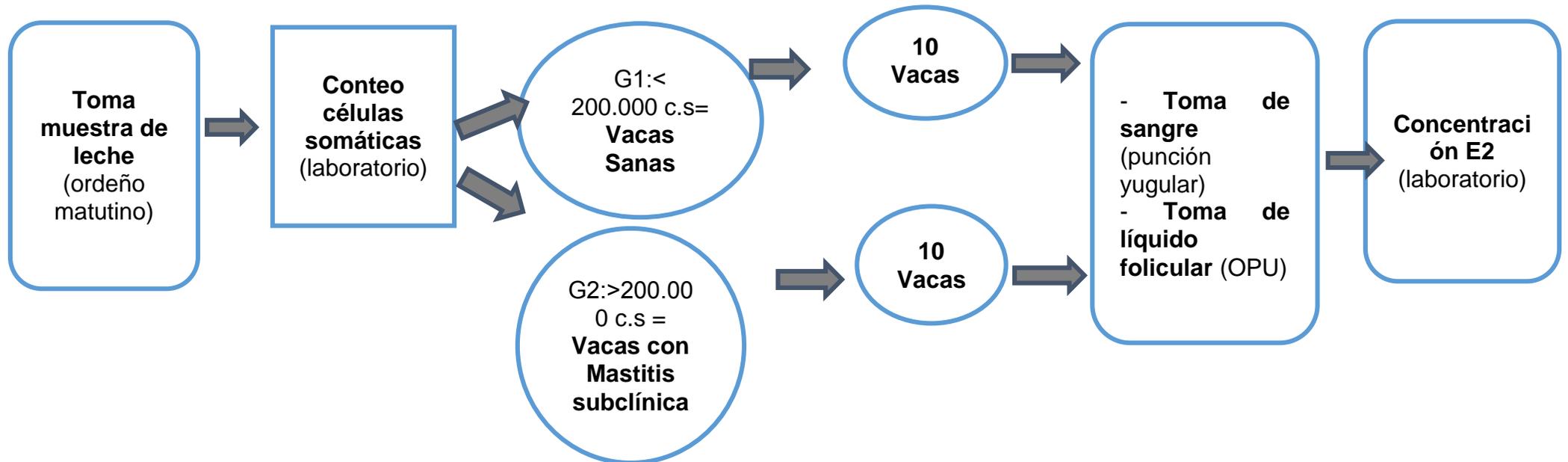


Anexo 4. Flujo grama de la metodología del ensayo 2





Anexo 6. Flujo grama de la metodología del ensayo 3





Anexo 7. Fotografías de las actividades de campo



Fotografía 1. Toma de muestras de leche (ordeño de la mañana)

Fuente: autoras



Fotografía 2. Identificación de las muestras de leche

Fuente: autoras



Fotografía 3. Transporte de muestras.

Fuente: autoras



Anexo 8. Registros reproductivos.

REGISTRO REPRODUCTIVO

HACIENDA El Eden Año 2017

| VACA | Nombre | Enero | Febrero | Marzo | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Septiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre |
|--------|----------------------|-------------------------------|---------------|--------------|-----------------------|-------------------|---------------|-------|--------|------------|---------|-----------|---------------------|
| Arleta | Brawton Lorena 230 | | OP-2 P-3 M | | | | | | | | | | OS-29 DP-27 Feb. |
| | Emerald Ximena 231 | Ti-18 Pa I-21 Doom Vaca | | C-19 P-22 | Ti-18 Pa I-21 Doom | C-19 I-21 Doom | C-6 I-8 Pa | | | | | | |
| | Emerald Yvonne 232 | P-3 M | | | | | | | | | | | |
| | Maryam Dalila 233 | I-3 Doom | | | | | | | | | | | |
| | Mariann Gaby 234 | I-3 Ovejas | | | | | | | | | | | |
| | Goya 236 | | | | | | | | | | | | |
| | Foster Rocío 239 | | | | | | | | | | | | |
| | Shawntara 240 | Ti-18 Feb | | | | | | | | | | | |
| | Tola 241 | I-3 Ovejas | | | | | | | | | | | |
| | Dance Daniela 242 | I-21 Nuevas Vaca | | | | | | | | | | | |
| | Shawntara Albino 245 | | | | | | | | | | | | |
| | Dallas Maria 246 | | | | | | | | | | | | |
| | Palermo Stefano 247 | | | | | | | | | | | | |
| | Mariann Mía 248 | | | | | | | | | | | | |
| | Dance Rocío 249 | +NECESARIA | | | | | | | | | | | |

Fotografía 4

REGISTRO REPRODUCTIVO

HACIENDA El Eden Año 2017

| VACA | Nombre | Enero | Febrero | Marzo | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Septiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre |
|--------|--------------|----------------------|---------|-------|-------|------|-------|-------|--------|------------|---------|-----------|-----------|
| Arleta | Rita 554 | | | | | | | | | | | | |
| | Crystal 555 | | | | | | | | | | | | |
| | Madie 556 | I-14 Ovejas | | | | | | | | | | | |
| | Brigida 559 | P-30 M | | | | | | | | | | | |
| | 560 | | | | | | | | | | | | |
| | Gonesa 561 | Ti-18 Pa I-22 Oct | | | | | | | | | | | |
| | 562 | | | | | | | | | | | | |
| | 566 | | | | | | | | | | | | |
| | Amanda 567 | | | | | | | | | | | | |
| | Quenda 569 | | | | | | | | | | | | |
| | Carina 570 | | | | | | | | | | | | |
| | Paloma 572 | | | | | | | | | | | | |
| | Lidia 573 | | | | | | | | | | | | |
| | Rosa 574 | | | | | | | | | | | | |
| | Rosemary 575 | | | | | | | | | | | | |

Fotografía 5



| | | | | | | | | | | | | |
|-----|--------------|-----|---|--------------------|------|-----|----------|---------------|------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 051 | 01-100415-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 331 | 90363717 | ELA 331 | 2016/10/07 | Vivo | MAPLE-DAWNS-I-G-W ATWOOD | JARAGUA DALLAS ESTELA ELECTRA |
| 052 | 01-100412-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 25% | 343 | 90363714 | ELAIDA 343 | 2017/01/08 | Vivo | R-E-W SEAVER-ET | JARAGUA ESTELA |
| 053 | 095331 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 259 | 10135636 | ELECTRA 259 | 2014/09/08 | Vivo | LINCOLN-HILL AR DALLAS-ET | JARAGUA EMILIA |
| 054 | 091633 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 193 | 10135573 | ELINA 193 | 2012/04/23 | Vivo | SANDY-VALLEY BOJANGLES-ET | JARAGUA BOJANGLES EMILIA ELINA |
| 055 | 01-100414-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 329 | 90363716 | ELISA 329 | 2016/10/13 | Vivo | WELCOM SUPER PETRON-ET | |
| 056 | 01-100001-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 217 | 0 | ELSA 217 | | | | |
| 057 | 092980 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 216 | 10135357 | ELVIRA 216 | 2013/02/18 | Vivo | GEN-MARK STAMATIC SANCHEZ | JARAGUA EMILY |
| 058 | 054058 | HOL | H | Identificada | ID | 9 | 51544 | EMILIA 9 | 2006/07/06 | Vivo | STBVO RUBENS | JARAGUA ELENA |
| 059 | 057394 | HOL | H | Identificada | ID | 99 | 10135550 | EMILY 99 | 2009/10/02 | Vivo | | JARAGUA EMERALD ESTRELLA ESTELAR |
| 060 | 098197 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 384 | 10136145 | ESMERALDA 384 | 2015/09/27 | Vivo | VAL-BISSON DOORMAN | JARAGUA EMILIA |
| 061 | 057411 | HOL | H | Identificada | ID | 187 | 10135568 | ESTELA 187 | 2012/03/26 | Vivo | L GLENN-ANN PALERMO-ET | JARAGUA ESTELA |
| 062 | 097715 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 290 | 10136058 | ESTER 290 | 2015/08/12 | Vivo | COYNE-FARMS BOLTON DOM-ET | JARAGUA ESTELA |
| 063 | 086255 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 271 | 10135721 | EVITIA 271 | 2018/01/26 | Vivo | SILDHAL AIR FORCE-ET | JARAGUA EVITIA |
| 064 | 087580 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 148 | | EVA 148 | 2011/03/29 | Vivo | REGANCREST DOLMAN-ET | JARAGUA EUGENIA |
| 065 | 01-100409-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 25% | 324 | 90363711 | EVA 324 | 2016/07/15 | Vivo | CANYON-BREEZE AT AIRLIFT-ET | |
| 066 | 056203 | HOL | H | Identificada | ID | 181 | | EVITA 181 | 2012/02/13 | Vivo | L CRACKHOLM FEVER | JARAGUA ENCORE ROSE FRANKELINA |
| 067 | 057397 | HOL | H | Identificada | ID | 112 | 10135553 | FABIOLA 112 | 2009/12/25 | Vivo | L SAVARD-ET 91% | JARAGUA ENCORE ROSE FRANKELINA |
| 068 | 097721 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 303 | 10136064 | GABRIELA 303 | 2015/09/19 | Vivo | OH-RIVER-SYG BYWAY-ET | JARAGUA GERA |
| 069 | 092967 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 234 | 10136364 | GABY 234 | 2013/08/12 | Vivo | S VEAZLAND MARION-ET | JARAGUA AIRRAID GOLDEN GINA |
| 070 | 093120 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 561 | 10136380 | GANESHA 561 | 2013/06/09 | Vivo | S MR CHASSITY GOLD CHIP-ET | EDEN MORTY COCA PATRICIA |
| 071 | 056202 | HOL | H | Identificada | ID | 180 | | GATA 180 | 2012/02/13 | Vivo | S GLENN-ANN PALERMO-ET | JARAGUA EMILY |
| 072 | 085387 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 474 | 50096 | GAVIOTA 474 | 2009/08/21 | Vivo | S CREEK BLITZ DR MCDUFF-ET | EDEN SONADORA |
| 073 | 087398 | HOL | H | Identificada | ID | 113 | 10135554 | GERA 113 | 2009/12/28 | Vivo | L | JARAGUA AIRRAID GOLDEN GINA |
| 074 | 085330 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 258 | 10136935 | GLADYS 258 | 2014/08/05 | Vivo | Y GLENN-ANN PALERMO-ET | JARAGUA AIRRAID GOLDEN GINA |
| 075 | 081841 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 238 | 10135983 | GELORIA 238 | 2012/11/08 | Vivo | L ART-ACRES MTOTO DOUG 444-ET | JARAGUA GOLDEN |
| 076 | 054059 | HOL | H | Identificada | ID | 81 | 51559 | GOLDEN 81 | 2008/08/08 | Vivo | L BRABDALE GOLDWYN | JARAGUA GOLDEN |
| 077 | 094459 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 236 | 10135442 | GOYA 236 | 2013/10/21 | Vivo | S VERZLAND MYSTICAL-ET | JARAGUA GOLDEN |
| 078 | 01-100379-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 319 | 90359698 | GRACIA 319 | 2015/09/12 | Vivo | L | JARAGUA DOUG 444 GOLDEN GLORIA |
| 079 | 038404 | HOL | H | Hembra pura | 100% | 203 | 10135538 | GRACIELA 203 | 2012/08/14 | Vivo | L BONAZ MARION EMERALD | JARAGUA TONI FRANKELINA GOTOMARA |
| 080 | 037232 | HOL | H | Hembra pura | 100% | 257 | 10135626 | GRASE 257 | 2014/05/01 | Vivo | L LINCOLN-HILL AR DALLAS-ET | JARAGUA EMERALD GOTOMARA GRACIELA |
| 081 | 097714 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 284 | 10138057 | GRECIA 284 | 2015/06/07 | Vivo | L SILDHAL AIR FORCE-ET | JARAGUA GATA |
| 082 | 059035 | HOL | H | Identificada | ID | 273 | 10133723 | ISIDORA 273 | 2015/03/08 | Vivo | L | JARAGUA ADDICTION INES ISOLINA-R |
| 083 | 091632 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 191 | 10135572 | ISOLINA-R 191 | 2012/04/18 | Vivo | S CLAYTOP ADDICTION-RED-ET | JARAGUA INES |
| 084 | | HOL | H | | | 220 | | JALISCA 220 | | | | |
| 085 | 057391 | HOL | H | Identificada | ID | 90 | 10135547 | JENNIFER 90 | 2009/08/30 | Vivo | L KHW KITE ADVENT-RED-ET | JARAGUA JENNIFER |
| 086 | 097304 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 287 | 10135812 | JESSICA-R 287 | 2015/09/23 | Vivo | L CHARPANTIER LFG SPECTRUM | JARAGUA JENNIFER |
| 087 | 057408 | HOL | H | Identificada | ID | 163 | 10135564 | KAREN 163 | 2011/07/12 | Vivo | L VEAZLAND MARION-ET | JARAGUA KAREN |
| 088 | 054050 | HOL | H | Identificada | ID | 54 | 51552 | KARLA 54 | 2008/01/17 | Vivo | S GILLETTE FINAL CUT-ET | JARAGUA KAREN |
| 089 | 086256 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 272 | 10135722 | KATY 272 | 2016/02/18 | Vivo | L SILDHAL AIR FORCE-ET | JARAGUA KELLY |
| 090 | 01-100420-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 359 | 90363721 | KELLA 359 | 2016/12/01 | Vivo | L R-E-W SEAVER-ET | JARAGUA KELLY |
| 091 | 057403 | HOL | H | Identificada | ID | 130 | 10135559 | KELLY 130 | 2010/07/01 | Vivo | L CLAYTOP ADDICTION-RED-ET | JARAGUA KARLA |
| 092 | 097716 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 293 | 10136059 | KIOTO 293 | 2015/08/21 | Vivo | L FUTURAMA BOLTON NAUTY | JARAGUA KELLY |
| 093 | 057413 | HOL | H | Identificada | ID | 201 | 10135578 | KISS 201 | 2012/07/24 | Vivo | S SCHILDALE SHUTTLE BRETT-ET | JARAGUA KARLA |
| 094 | 091062 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 547 | 10135182 | LAILA 547 | 2012/12/14 | Vivo | L PINE-TREE SID-ET | EDEN GOLDWYN II CHAGRA VANIDOSA |
| 095 | 01-100419-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 338 | 90363720 | LENA 338 | 2016/11/24 | Vivo | L R-E-W SEAVER-ET | EDEN GOLDWYN II CLARA LUNA |
| 096 | 01-100179-03 | HOL | H | | | 673 | | LIDITA 673 | | | | |
| 097 | 056198 | HOL | H | Identificada | ID | 169 | | LORENA 169 | 2011/09/15 | Vivo | L VEAZLAND MARION-ET | JARAGUA LORENA |
| 098 | 01-100403-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 310 | 90363705 | LORENA 310 | 2016/01/03 | Vivo | L SEAGULLBAY JJ MAJOR-ET | JARAGUA LORENA |
| 099 | | HOL | H | | | 232 | | LOURDES 232 | | | | |
| 100 | 054055 | HOL | H | Identificada | ID | 25 | 51547 | LUCERITO 25 | 2007/04/12 | Vivo | L POLY-KOW MAILING-ET | JARAGUA LORENA |
| 101 | 057400 | HOL | H | Identificada | ID | 124 | 10135556 | LUCIA-R124 | 2010/04/19 | Vivo | L SAVARD-ET 91% | JARAGUA LORENA |
| 102 | 095329 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 256 | 10135834 | LUCIANA 256 | 2014/08/27 | Vivo | L LINCOLN-HILL AR DALLAS-ET | JARAGUA BOJANGLES LUCY LUNA |

Fotografía 6

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

HACIENDA 3L3DZ Año 2018

Tratamiento
E. Mucho
F. Poca
G. Medio
V. Secado
E. Doble

Tr. Estímulo
Ep. Doble-paja
E. Doble

| ANIMAL | Fecha | Evento | Tratamiento | Estado | Observaciones | Septiembre | Octubre | Noviembre | Diciembre |
|---------|-------------|---------|-------------|----------|---------------|------------|---------|-----------|-----------|
| | 400 | 4-24 | I-2-14 | PR-14 | 4-15 | | | | |
| | 417 | | VACIA | C-3 | | | | | |
| | 430 | | | | | | | | |
| | 439 | I-2-3 | VACIA | C-15 | CNS-6 | C-22 | | | |
| AURORA | 458 | | I-2-14 | C-2 | 4-10 | | | | |
| FEODORO | 484 | C-15 | I-2-5 | PR+19 | | | DS-11 | | DP-11 |
| QUITENA | 527 | DP-24 | VIR. K-24 | | | | | | DP-1 |
| BRANTON | PIRSTA 545 | | VACIA | I-1-OLIO | PR+ | | | | |
| | LAYLA 547 | DS-10 | | DP-11 | P-27-H | | | | |
| BRANTON | PUMINZA 549 | | | | | | | | |
| | MOLENA 550 | | DS-9 | | DP-10 | | | | |
| | | | | | P-5-M | | | | |
| | MARCE 556 | I-10-14 | | PR+19 | | | | DP-19 | |
| | BURGIDA 559 | PR+29 | | | | | DS-2 | | DP-2 |
| | 560 | PR+29 | | | | | DS-28 | | DP-28 |
| | GANESHA 561 | DS-17 | | DP-18 | P-17-H | | | | |

Fotografía 7

INVENTARIO DEL CRIADERO RANCHO JARAGUA

| # | Registro | Raza | Sexo | Tipo | Cruza | Artes | Artes O. | Nombre | F. Nacimiento | Est. | Est Padre | Madre |
|-----|--------------|------|------|--------------------|-------|-------|----------|---------------|---------------|------|-----------|-----------------------------|
| 001 | 01-100436-03 | HOL | H | | | 285 | 285 | | | Y | | |
| 002 | 01-100440-03 | HOL | H | | | 295 | 295 | | | Y | | |
| 003 | 01-100441-03 | HOL | H | | | 400 | 400 | | | L | | |
| 004 | 01-100044-03 | HOL | H | | | 417 | 417 | | | L | | |
| 005 | 01-100366-03 | HOL | H | | | 430 | 430 | | | L | | |
| 006 | 01-100054-03 | HOL | H | | | 432 | 432 | | | L | | |
| 007 | 01-100076-03 | HOL | H | | | 439 | 439 | | | Y | | |
| 008 | 01-100025-03 | HOL | H | | | 530 | 530 | | | Y | | |
| 009 | 01-100090-03 | HOL | H | | | 560 | 560 | | | L | | |
| 010 | 01-100039-03 | HOL | H | | | 596 | 596 | | | S | | |
| 011 | 01-100019-03 | HOL | H | | | 314 | 90363709 | ABIGAIL 314 | 2016/02/24 | Vivo | | COYNE-FARMS BOLTON DOM-ET |
| 012 | 01-100407-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 25% | 333 | 90363718 | ADELA 333 | 2016/11/10 | Vivo | | END-ROAD SHOTTLE MCAH-ET |
| 013 | 01-100416-03 | HOL | H | Hembra pura | 100% | 247 | 10135441 | ADELINA 247 | 2014/05/28 | Vivo | L | GLENN-ANN PALERMO-ET |
| 014 | 037051 | HOL | H | Hembra pura | 100% | 395 | 90363719 | AGATA 395 | 2016/11/09 | Vivo | L | GREENLEA ARTIE-RED-ET |
| 015 | 01-100417-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 153 | | ALEJANDRO 500 | 2011/05/12 | Vivo | L | PURSUIT SEPTEMBER STORM |
| 016 | 035452 | HOL | H | Hembra pura | 100% | 508 | 10135870 | ALEJANDRO 500 | 2015/08/01 | Vivo | Y | GLENN-ANN PALERMO-ET |
| 017 | 019727 | HOL | M | Macho puro | 0% | 248 | 10135442 | ALFONSINA 245 | 2014/05/05 | Vivo | Y | STRAUBSDALE OS SHOWMAN-ET |
| 018 | 094463 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 231 | 10135395 | ALICIA 231 | 2013/06/30 | Vivo | Y | BOMAZ MARION EMERALD |
| 019 | 038901 | HOL | H | Hembra pura | 100% | 231 | 90363304 | ALONDRA 231 | 2016/05/01 | Vivo | L | DOLDSFRINGS OWEN 9344 |
| 020 | 01-100385-03 | HOL | H | Hembra pura | 100% | 567 | | AMADA 567 | | | | |
| 021 | 01-100019-03 | HOL | H | | | 312 | 90363707 | ANGELA 312 | 2016/02/13 | Vivo | | CHARCOAL MACHO PIERCE |
| 022 | 01-100405-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 25% | 448 | 448 | AURORA 458 | 2009/05/08 | Vivo | S | KLUMBS DURHAM PONTAC |
| 023 | 082641 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 142 | 10135561 | BELINDA 142 | 2011/03/04 | Vivo | L | PURSUIT SEPTEMBER STORM |
| 024 | 057405 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 250 | 10135629 | BELISA 250 | 2014/07/19 | Vivo | L | ERSTVIEW GARRET-ET |
| 025 | 095324 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 62 | 10135641 | BELLA 62 | 2008/08/13 | Vivo | L | RAEPMLE GOLDWYN |
| 026 | 057385 | HOL | H | Identificada | ID. | 559 | | BRIGIDE 559 | | | | |
| 027 | | HOL | H | | | 561 | 90356700 | CANDI 561 | 2015/10/15 | Vivo | Y | R-E-W SEAVER-ET |
| 028 | 01-100381-03 | HOL | H | Hembra pura | 100% | 261 | | CANELA 261 | | | | |
| 029 | 01-100247-03 | HOL | H | | | 570 | | CARIÑO 570 | | | | |
| 030 | 01-100073-03 | HOL | H | | | 313 | 90363708 | CARMEN 313 | 2016/01/08 | Vivo | | SEAGULLBAY JJ MAJOR-ET |
| 031 | 01-100406-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 25% | 317 | 90363303 | CECIBEL 317 | 2016/04/09 | Vivo | | SEAGULLBAY JJ MAJOR-ET |
| 032 | 01-100384-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 147 | | CECILIA 147 | 2011/03/15 | Vivo | L | PURSUIT SEPTEMBER STORM |
| 033 | 067579 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 562 | 10135381 | CHATURTHI 562 | 2013/09/09 | Vivo | S | MR CHASSITY GOLD CHIP-ET |
| 034 | 093121 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 269 | | CLARA 269 | | | | |
| 035 | 01-100364-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 25% | 315 | 90363302 | CLARITA 315 | 2016/02/27 | Vivo | L | COMESTAR LHEROS |
| 036 | 01-100383-03 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 25% | 233 | | DALIA 233 | | | | |
| 037 | | HOL | H | Identificada | ID. | 186 | 10135567 | DALILA 186 | 2012/02/16 | Vivo | S | CLAYTOP ADDICTION-RED-ET |
| 038 | 057410 | HOL | H | Identificada | ID. | 214 | 10135589 | DANIELA 214 | 2013/01/16 | Vivo | S | ART-ACRES MTOTO DOUG 444-ET |
| 039 | 057416 | HOL | H | Identificada | ID. | 254 | | DANITA 254 | | | | |
| 040 | 01-100365-03 | HOL | H | | | 484 | 50099 | DE LOTO 484 | 2010/03/15 | Vivo | L | WINDY-KNOLL-VIEW PRONTO-ET |
| 041 | 085370 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 255 | 10135633 | DELFINA 255 | 2014/08/19 | Vivo | L | EASTVIEW GARRET-ET |
| 042 | 085328 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 60% | 131 | 52726 | DEVORA 131 | 2010/07/09 | Vivo | S | FAR-O-LA DEVOTED-ET |
| 043 | 054569 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 204 | 10135680 | DIGNA 204 | 2012/09/09 | Vivo | S | GEN-MARK STMATIC SANCHEZ |
| 044 | 091838 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 288 | 10135613 | DOLLY 288 | 2015/07/02 | Vivo | L | PALMCREST MONUMENT-ET |
| 045 | 057305 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 242 | 10135444 | DOMENICA 242 | 2014/03/15 | Vivo | L | ROCHER STER DANCER-RED |
| 046 | 054480 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 50% | 274 | 10135811 | DORITA 274 | 2015/03/09 | Vivo | Y | O-BEE MANFRED JUSTICE-ET |
| 047 | 097303 | HOL | H | Holstein ecuatoria | 75% | 121 | | DUMA 121 | | | | |
| 048 | | HOL | H | | | 138 | 10135560 | DUNIA 138 | 2010/12/25 | Vivo | L | PURSUIT SEPTEMBER STORM |
| 049 | 057404 | HOL | H | Identificada | ID. | 110 | 10135540 | EDITA 110 | 2009/12/03 | Vivo | L | JARAGUA PERLA |
| 050 | 057415 | HOL | H | Identificada | ID. | | | | | | | |

Fotografía 8

Fotografías (4-8). Registros reproductivos de las ganaderías en estudio.

Fuente: autoras



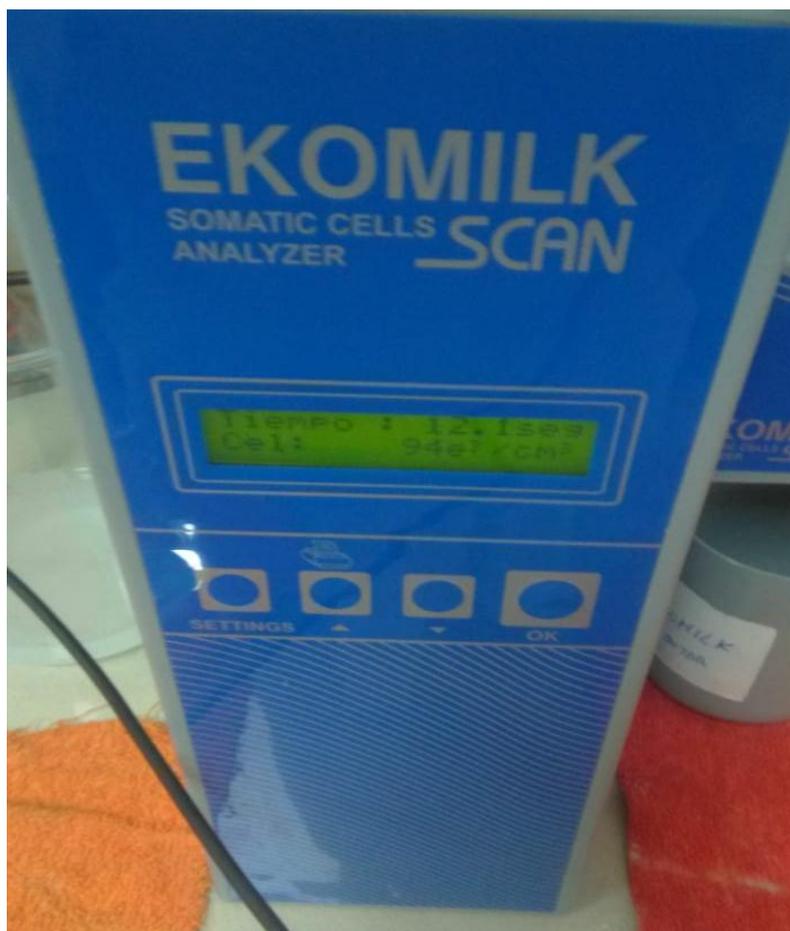
Anexo 9. Análisis de leche en el laboratorio.



Fotografía 9



Fotografía 10



Fotografía 11

Fotografías (9-11). Equipo para analisis de leche (diagnostico de mastitis subclinica.)

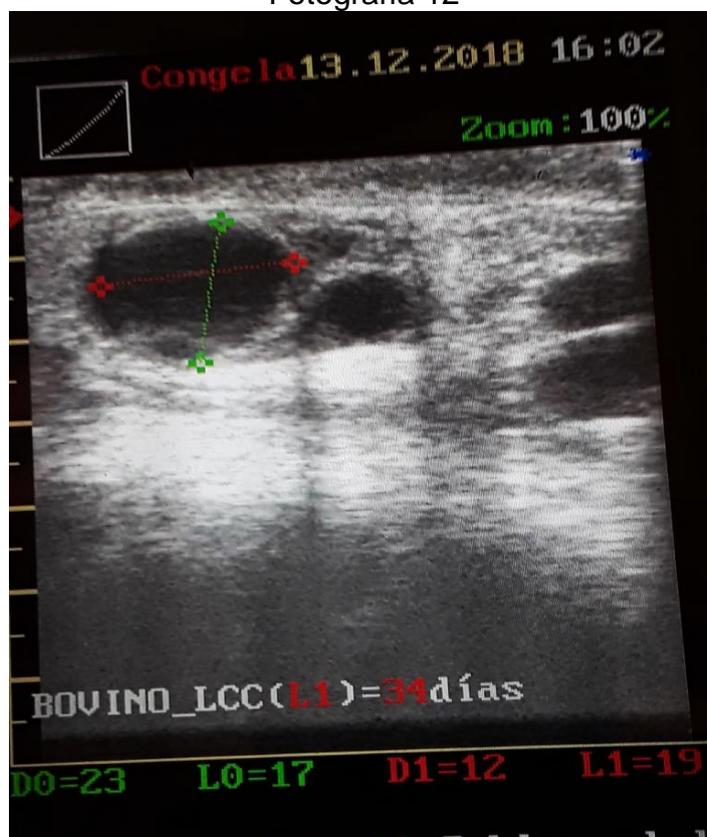
Fuente: autoras



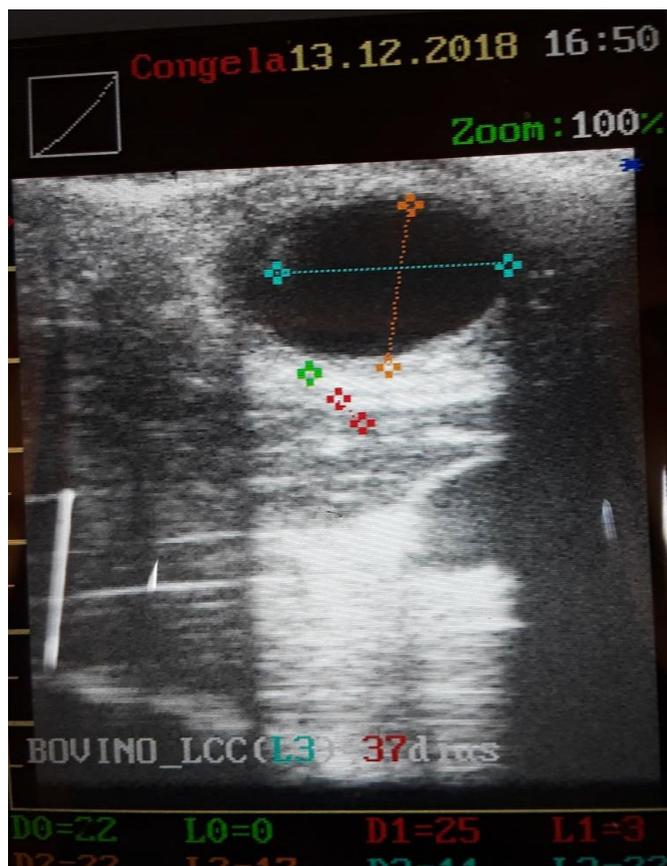
Anexo 10. Ecografía de Folículo Preovulatorio.



Fotografía 12



Fotografía 13



Fotografía 14

Fotografías (12-14). Ecografía para medición de Folículo Preovulatorio.

Fuente: autoras