



Orinoquia

ISSN: 0121-3709

orinoquiacolombiana@hotmail.com

Universidad de Los Llanos

Colombia

Méndez- Leal, Diana C.; Góngora- Orjuela, Agustín; Gómez- Leal, Luz A.
Aislamiento e identificación de la flora bacteriana uterina en vacas donantes de embriones
Orinoquia, vol. 18, núm. 1, -, 2014, pp. 86-91
Universidad de Los Llanos
Meta, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89637907010>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Aislamiento e identificación de la flora bacteriana uterina en vacas donantes de embriones

Isolating and identifying uterine bacterial flora in embryo-donor cows

Isolamento e identificação da flora bacteriana uterina em vacas doadoras de embriões

Diana C. Méndez- Leal¹, Agustín Góngora- Orjuela², Luz A. Gómez- Leal³.

¹ Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Ejercicio particular.

² MV, MSc, Dr Sci. Grupo de investigación en Reproducción y Genética Animal (GIRGA) Escuela de MVZ Universidad de los Llanos.

³ Bacterióloga. Escuela de MVZ Universidad de los Llanos.
Email: agongora@unillanos.edu.co

Recibido: Julio 19 de 2013.

Aceptado: Marzo 27 de 2014.

Resumen

Se aisló e identificó la flora bacteriana en 21 vacas donantes de embriones a partir del lavado uterino al momento de recolección de los embriones al día 7 posinseminación. La identificación bacteriana se realizó por métodos convencionales basados en las características fenotípicas, morfología, desarrollo, pruebas bioquímicas y metabólicas. Las bacterias identificadas fueron *Proteus mirabilis* 4.8%, *Archanobacterium pyogenes* 4.8%, *Klebsiella ozaenae* 9.5%, *E. coli* 14.2%, *Shiguella sonnei* 23.8%, *Bacillus spp* 33.3%, *Pseudomona aeruginosa* 52.3% y *Staphylococcus spp.* 47.6%. En 28.6% de las vacas se identificó solo una bacteria, 52.4% dos bacterias y 19% tres o más bacterias. La alta diversidad bacteriana sugiere diversos orígenes y nuevos estudios sobre su papel individual o sinergismo en el desarrollo de la enfermedad uterina y posibles efectos sobre la respuesta superovulatoria.

Palabras clave: infección uterina, bacterias, transferencia de embriones (DeCs).

Abstract

Bacterial flora were isolated and identified in 21 embryo-donor cows from uterine washing when collecting embryos on day 7 post-insemination. Bacteria were identified by conventional methods based on phenotypical and morphological characteristics, development and biochemical and metabolic tests. The bacteria identified were *Proteus mirabilis* (4.8%), *Archanobacterium pyogenes* (4.8%), *Klebsiella ozaenae* (9.5%), *E. coli* (14.2%), *Shiguella sonnei* (23.8%), *Bacillus spp.* (33.3%), *Pseudomona aeruginosa* (52.3%) and *Staphylococcus spp.* (47.6%). A single bacterium was identified in 28.6% of the cows, two bacteria in 52.4% of the cows and three or more bacteria in 19% of them. The high bacterial diversity suggested various origins; new studies into their individual role and/or synergism regarding the development of uterine disease and possible effects on superovulatory response are needed.

Key words: Uterine infection, bacteria, embryo transfer (DeCs).

Resumo

Foi isolada e identificada a flora bacteriana em 21 vacas doadoras de embriões, a través de lavagem uterina, no dia 7 após a inseminação ao momento da colheita dos embriões. Identificação bacteriana foi realizada por métodos convencionais baseados em características fenotípicas, morfologia, desenvolvimento, testes bioquímicos e metabólicos. As bactérias identificadas foram *Proteus mirabilis* 4.8%, *Archanobacterium pyogenes* 4.8%, *Klebsiella ozaenae* 9.5%, *E. coli* 14.2% *Shigella sonnei* 23.8%, *Bacillus spp* 33.3%, *Pseudomona aeruginosa* 52.3% e *Staphylococcus spp.* 47.6%. Em 28,6% das vacas foi identificada apenas uma bactéria, duas bactérias em 52,4% e 19%, três ou mais bactérias. Diversidade bacteriana alta sugere diferentes origens e mais estudos sobre seu papel individual ou sinérgica no desenvolvimento de doenças uterinas e os possíveis efeitos sobre a resposta superovulatória.

Palavras-Chave: Infecção Uterina, Bactérias, Transferência De Embriões (Decs).

Introducción

Desde la aplicación con fines comerciales en la década de los años 70 del siglo pasado, la transferencia de embriones (TE) ha tenido un amplio uso. De acuerdo con las estadísticas de la Sociedad Internacional de Transferencia de embriones (IETS) en el año 2007 se transfirieron 1.198.078 embriones (Thibier, 2008), a la fecha aunque no se tienen cifras actualizadas, se cree que este número ha aumentado significativamente, especialmente por la mayor demanda en los países de Suramérica.

Durante los últimos 40 años ha sido inmenso el progreso de la TE, debido en parte al diseño de mejores protocolos de superovulación, recolección de los embriones y crioconservación, aunque el número promedio de embriones obtenidos no ha cambiado (Hasler, 2014).

En el éxito de un programa de TE, mediante estimulación ovárica *in vivo* intervienen diversos factores, encontrando notables diferencias en las tasas de preñez, ya sea si los embriones son producido "*in vivo*" o "*in vitro*" (Wu y Zan, 2012). Dentro de los factores mencionados, el estado fisiológico y sanitario de la donante cobra importancia, por lo que desde el inicio de la aplicación de la técnica surgieron interrogantes sobre la posible transmisión de agentes patógenos a la receptora, estudios que concluyeron finalmente que el riesgo es mínimo si se siguen las recomendaciones de la IETS (Stringfellow, 1998; Stringfellow *et al.*, 2004; Mapletoft y Hasler, 2005), este riesgo es menor aun si se compara con el semen o la movilización de animales vivos entre países (Wrathall, 1995; Givens y Marley, 2005).

De otro lado, se conoce que las infecciones uterinas en las vacas ocasionan daño en el endometrio y alteran la funcionalidad del ovario. Sheldon *et al* (2002) reportan que la contaminación bacteriana posparto tiene efec-

tos sobre el crecimiento y el desarrollo folicular pero no sobre la emergencia folicular. Además, en las vacas que sufren infecciones uterinas, se produce un cambio en la producción de prostaglandina E_2 en vez de prostaglandina F_2 , lo que ocasiona fases luteales prolongadas (Williams *et al.* 2008b; Herath *et al.* 2009a), todo lo anterior podría afectar la respuesta superovulatoria.

Las infecciones uterinas pueden afectar la respuesta superovulatoria en función del tiempo que lleven de transcurrido el posparto. Después del parto, el útero sufre una recuperación espontánea en su estado inmunológico que le permite la eliminación progresiva de bacterias durante las primeras 5 semanas posparto, sin embargo la eliminación de estas bacterias no es total y entre el 10-17% de los animales persisten infecciones bacterianas subclínicas (Borsberry y Dobson, 1989; LeBlanc *et al.*, 2002).

Las bacterias más comúnmente aisladas del útero dentro de los primeros 10 días posparto fueron *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* y *Bacillus spp.* (Williams *et al.*, 2005), mientras que *Fusobacterium necrophorum* (*F. necrophorum*), *Prevotella melaninogenica* (*P. melaninogenica*) y *Escherichia coli* (*E. coli*) fueron aisladas de vacas con metritis (Bonnett *et al.*, 1991; Bondurant 1999; Huszenicza *et al.*, 1999; Gilbert *et al.*, 2007).

Las bacterias aeróbicas y anaeróbicas del útero y su potencial patógeno se han clasificado en tres tipos i) bacterias patógenas *A. pyogenes*, *E. coli*, *P. melaninogenica* y *F. necrophorum*, ii) bacterias potencialmente patógenas: *Enterococcus faecalis*, *Bacillus licheniformis*, *M. haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Peptostreptococcus species*, *Staphylococcus aureus*, *Non-haemolytic Streptococci* y iii) bacterias no patógenas: *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus species*, *Providencia stuartii*, *Proteus species*, *Staphylococcus species*, coagulase negative,

Non-haemolytic Streptococci , Streptococcus acidominus, Aspergillus species (Williams *et al.*, 2005)

El objetivo de este estudio, fue aislar e identificar la microflora uterina de vacas donantes de embriones como un paso previo para posteriores estudios que permitan entender su ecología, la relación con los trastornos reproductivos y la orientación de los tratamientos terapéuticos, todo esto en la búsqueda de una mayor eficiencia de la técnica de TE.

Materiales y métodos

Animales experimentales

Se utilizaron 21 vacas donantes de embriones entre 2-6 partos de las razas Sanmartinero, Jersey, Gyr y Brahman ubicadas en 6 fincas que desarrollaban programas de TE de los municipios de Villavicencio, Cumaral y Paratebueno.

Toma de muestras para cultivo e identificación bacteriana

Las muestras para cultivo se obtuvieron mediante pipetas Pauster estériles directamente del filtro Millipore de 0.45µ utilizado para la recolección de los embriones el día 7 posinseminación. Para el lavado uterino se utilizó 500 ml de Ringer lactato® que fue infundido mediante un catéter folley® de 3 vías. Aproximadamente 5.0 ml de la muestra fueron puestos en tubos tapa rosca de 10 ml conteniendo el medio BHI y transportados en cadena de frío a 4°C hasta el Laboratorio de microbiología de la Universidad de los Llanos. Los tu-

bos fueron llevados a incubación por 24 horas a 37°C, tiempo en el que se observó la presencia de turbidez de las muestras, la cual fue considerada como criterio de crecimiento bacteriano. De cada muestra se realizó una coloración de Gram y las muestras Gram+ se sembraron por agotamiento en agar sangre (Oxoid®). Las muestras Gram- se sembraron en agar McConkey y posteriormente en medios selectivos SS, XLD, Agar bismuto de acuerdo a la técnica de (Bergey, 1994). Aquellas muestras que presentaron crecimiento en los medios diferenciales y selectivos se realizaron pruebas de identificación bioquímica como TSI, Simonds citrato, SIM, urea, MRVP, gelatina, nitratos y los azúcares manosa, galactosa, arabinosa, manitol, sorbitol. Los cultivos con cocos Gram+ se realizaron pruebas de oxidasa y coagulasa.

Análisis estadístico

Se creó una base de datos en Excel y analizada la información mediante estadística descriptiva.

Resultados

La microflora bacteriana encontrada en las vacas objeto de la presente investigación fueron en orden de mayor a menor *Pseudomona aeruginosa* 52.4% (11/21), *Staphylococcus spp* 47.6%(9/21), *Bacillus spp.* 33.3% (7/21), *Shigella sonnei* 23.9% (5/21), *E. coli* 14.2% (3/21), *Klebsiella ozaenae*. 9.52% (2/21), *Proteus mirabilis* 4.8% (2/21), *Archanobacteriun spp.* 4.8% (1/21). En la figura 1 se observa el porcentaje de vacas en las cuales fue aislada una, dos o tres o más bacterias del útero de las vacas donantes de embriones.

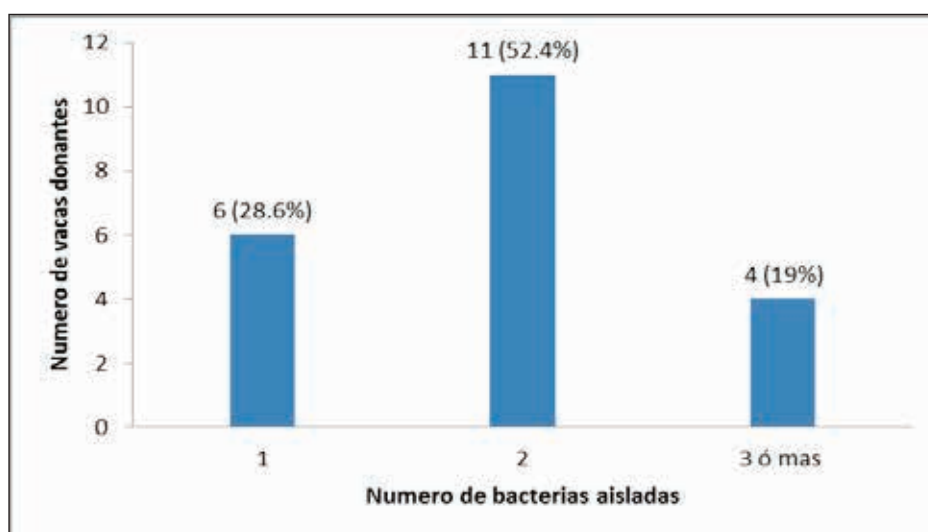


Figura 1. Porcentaje de vacas donantes de embriones de acuerdo con el numero de bacterias aisladas del útero

Discusión

La presencia de un alto número de bacterias aisladas en los lavados uterinos de vacas donantes de embriones en este estudio, sugiere diversas lecturas, entre ellas la procedencia de las mismas. Es posible que algunas de ellas provengan de infecciones persistentes asociadas al último parto y que no fueron eliminadas dentro del proceso normal de desinfección del útero por parte del sistema inmunológico local. El endometrio se convierte en la primera barrera física contra las infecciones uterinas, además cumple un importante papel en la inmunidad innata, así en el útero los polimorfonucleares reconocen los agentes patógenos mediante los receptores Toll, adicionalmente las células endometriales responde a los lipopolisacáridos (LPS) de algunas de las bacterias vía los receptores Toll 4 (TLR4) lo que desencadena una cascada de citoquinas y quimoquinas, por tanto, cuando se afectan estos mecanismos se presenta la enfermedad uterina (Williams, 2013).

Las diferentes bacterias, igualmente podrían provenir del semen, a pesar que durante el proceso de producción se adicionan antibióticos de amplio espectro, estos no eliminan la totalidad de las bacterias, las cuales pueden aparecer en los lavados uterinos. Esta posibilidad es mayor cuando se inseminan las vacas dos veces, buscando una mayor producción de embriones, como fue el procedimiento utilizado en este estudio. Algunas de las bacterias encontrados en nuestro estudio, coinciden con las aisladas del semen del toro entre ellas *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.*, and *Bacillus Spp* (Strigelow y Givens, 2000).

Aunque en el proceso de obtención de los embriones se siguieron todos los protocolos de limpieza y desinfección recomendados por la IETS, es posible que otra fuente de infección bacteriana proviniera entre otros, de la contaminación ambiental durante el proceso del lavado uterino, los componentes de los medios de cultivo y de fuentes humanas, como ha sido sugerido por Stringfellow y Givens (2000).

Respecto a las bacterias encontradas, en 3 vacas se aisló *E. coli*, mientras en solo una *A. pyogenes*, esto merece un análisis especial, puesto que se ha visto que *E. coli* puede aumentar la susceptibilidad del endometrio para una posterior infección por *A. pyogenes* (Gilbert *et al.* 2007; Williams *et al.*, 2007), a la vez *A. pyogenes* (recientemente reclasificado como (*Trueperella pyogenes*) (Yassin *et al.*, 2011), puede actuar sinérgicamente con *F. necrophorum* y *P. melaninogenecus* aumentando la severidad de la enfermedad uterina (Ruder *et al.*, 1981; Bonnett *et al.* 1991). La especie de *E. coli* que ocasiona enfermedad uterina es diferente de la *E. coli*

patogénica extra intestinal, por lo que se le dio el nombre de *E. coli* patogénica endometrial (EnPEC), esta se adhiere más fácilmente a las células endometriales y estimula una mayor producción de Prostaglandina E_2 y Interleukina 8 que es el factor quimotáctico para los neutrófilos (Sheldon *et al.*, 2010).

Respecto a *T. pyogenes*, ésta produce la citotoxina pyolisina que es dependiente de colesterol (Miller *et al.*, 2007) y un factor de crecimiento para *F. necrophorum* (Sheldon y Dobson 2004), aumentando así los efectos patógenos.

Adicionalmente se conoce que ciertos productos bacteriales o sustancias derivadas del proceso inflamatorio del útero pueden afectar el crecimiento folicular y finalmente suprimir la ovulación (Peter y Bosu, 1988; Peter *et al.*, 1989).

Recientemente se comparó el proteoma uterino de vacas infectadas con *T. pyogenes* y el de vacas sanas, encontrando un aumento en la expresión de ciertas proteínas indicadoras que esta bacteria puede afectar la habilidad de las vacas para concebir (Legard *et al.*, 2013).

En vacas de leche con trastornos reproductivos la flora bacterial normal fue *Lactobacillus* sp (16.6%), *Klebsiella* sp (16.6%) y bacterias patógenas como *Streptococcus* sp. β hemolítico (33.3%), *Streptococcus* sp α hemolítico (50%) *Streptococcus* sp. y hemolítico (50%) y *A. pyogenes* (16.6%) (Sánchez *et al.*, 2011).

En otro estudio en vacas Holstein mediante la detección de polimorfismos de fragmentos de restricción terminal (T-RFLP), la composición bacteriana uterina presentó diferencias de acuerdo con los días posteriores al parto y diferencias entre los hatos (Elkjær *et al.*, 2013).

Un hallazgo importante de las infecciones bacterianas es su relación con el estado endocrino del animal, así bajo el predominio de la progesterona se suprime los mecanismos de defensa uterina, por lo tanto la formación del primer cuerpo lúteo después del parto y la secreción de progesterona anteceden la presencia de enfermedad uterina (Lewis 1997; 2004). Es necesario aclarar que en el presente estudio, se evidenció la presencia de infección uterina, más no la presencia de enfermedad uterina la cual no estaba dentro de los propósitos del mismo.

Dado que la composición de la microbiota uterina y sus efectos sobre los desórdenes reproductivos ha sido poco estudiada y entendida (Santos y Bilcalho, 2012) un primer paso es la identificación bacteriana, lo cual coincide con los propósitos de este estudio. Además

permitiría avanzar en el conocimiento de los complicados mecanismos que afectan la fisiología reproductiva y el sinergismo patológico entre la gran diversidad bacteriana encontrada.

De otro lado, se considera que la presencia de bacterias en útero no tendría mayor riesgo de transmisión a las receptoras si se siguen los procedimientos recomendados por la IETS entre ellos el uso de antibióticos en los medios y el lavado de los embriones por lo menos 10 veces, lo que eliminaría la mayoría de bacterias que se pudieran adherir a la zona pelúcida (Stringfellow y Seidel, 1998).

Finalmente, en este estudio, se identificó una alta diversidad de bacterias en los lavados uterinos de vacas donantes de embriones, aunque solo dos de ellas *E. coli* y *T. pyogenes* han sido reportadas como patógenas, sin embargo el riesgo de transmisión a las receptoras puede ser menor si se siguen las recomendaciones de la IETS. Un buen monitoreo del estado de salud general y uterina de las donantes podrían ofrecer mejores resultados de la TE, evitando de esta forma que las infecciones uterinas puedan afectar los mecanismos endocrinos y de paso la respuesta superovulatoria.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Se expresan agradecimiento a los Doctores, Carlos J. Gómez y Miguel A. Peña por al apoyo en la obtención de las muestras.

Referencias

Bergey DH. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th edn. (Eds J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams.) (Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.).

Bielanski A. Disinfection procedures for controlling microorganisms in the semen and embryos of humans and farm animals. *Theriogenology*, 2007; 68:1–22

Bondurant RH. Inflammation in the Bovine Female Reproductive Tract. *J Anim Sci*. 1999; 77(Suppl 2): 101-10.

Bonnett BN, Martin SW, Gannon VP, Miller RB, Etherington WG. Endometrial Biopsy in Holstein-Friesian Dairy Cows III. Bacterial Analysis and Correlations with Histological Findings. *Can J Vet Res*. 1991; 55:168-173.

Borsberry S, Dobson H. Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *Vet Rec*. 1989; 124:217–219.

Bosu WTK, Peter AT. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows. *Therio*. 1987; 28:725-736.

Elkjær K, Ancker ML, Gustafsson H, Friggens NC, Waldmann A, Mølbak L, *et al*. Uterine bacterial flora in postpartum Danish Holstein dairy cows determined using DNA-based fingerprinting: Correlation to uterine condition and calving management. *Anim Reprod Sci*, 2013; 138:39–48

Gilbert RO, Santos NR, Galvão KN, Brittin SB, Roman HB. The Relationship between Postpartum Uterine Bacterial Infection (BI) and Subclinical Endometritis (SE). *J. Dairy Sci*. 2007; 90(Suppl. 1):469 (Abstr).

Givens MD, Marley SD. Approaches to biosecurity in bovine embryo transfer programs. *Theriogenology*, 2008; 69:129–136

Griffin JFT, Hartigan PJ, Nunn WR. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology*, 1974; 1:91–106

Hasler JF. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*. 2014; 81:152–169.

Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE *et al*. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2alpha to prostaglandin E2 in bovine endometrium. *Endocrinology*, 2009a; 150:1912–1920.

Huszenicza G, Fodor M, Gacs M, Kulscar M, Dohmen MJ, Vamos M. *et al*. Uterine Bacteriology, Resumption of Ovarian Activity and Fertility in Postpartum Cows Kept in Large-scale Dairy Herds. *Reprod Domest Anim*. 1999; 34:237-245.

LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, *et al*. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, 2002; 85:2223–2236.

Ledgard AM, Smolenski GA, Henderson H, Lee RSF. Influence of pathogenic bacteria species present in the postpartum bovine uterus on proteome profiles. *Reprod Fertil Dev*. <http://dx.doi.org/10.1071/RD13144>

Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci*, 1997; 80:984–94.

Lewis GS. Steroidal regulation of uterine immune defenses. *Anim Reprod Sci*, 2004; 82–83:281–94.

Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*. 2005; 24 (1):393-403

Miller AN, Williams EJ, Sibley K, Herath S, Lane EA, Fishwick J. *et al*. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology*, 2007; 68:972-980.

Peter AT, Bosu WTK. Relationship of uterine infections and folliculogenesis in dairy cows during early puerperium. *Theriogenology*, 1988; 30:1045–1051.

- Peter AT, Bosu WTK, DeDecker RJ. Suppression of preovulatory luteinizing hormone surges in heifers after intrauterine infusions of *Escherichia coli* endotoxin. *Am J Vet Res*, 1989;50:368–373.
- Ruder CA, Sasser RG, Williams RJ, Ely JK, Bull RC, Butler JE. Uterine Infections in the Postpartum Cow. II. Possible Synergistic Effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology*, 1981; 15:573-580.
- Sánchez M, González C, Castañeda R Pulido A, Guáqueta H, Aranda M, *et al.* Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos (estudio preliminar). *Rev MVZ Córdoba*, 2011; 16(3):2711-2720.
- Santos TMA, Bicalho RC. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS ONE* 2012; 7(12): e53048
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*, 2002;123:837–845.
- Sheldon IM, Dobson H. Postpartum Uterine Health in Cattle. *Anim Reprod Sci*. 2004; 82-83: 295-306.
- Sheldon M, Lewis G, LeBlanc S, Robert OG. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 2006; 65:1516–1530
- Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, *et al.* Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic Inflammatory Disease in Cattle and Mice. *PLoS One*, 2010; 5(2):e9192.
- Stringfellow DA. (1998). Recommendations for the sanitary handling of *in vivo* derived embryos. In *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology, emphasizing sanitary procedures* (D.A. Stringfellow & S.M. Seidel, eds), 3rd Ed. International Embryo Transfer Society, Savoy, Illinois, 79-84
- Stringfellow DA, Seidel SM. (1998). *Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures*, 3rd Ed. IETS, Savoy, Illinois, 172 pp.
- Stringfellow DA, Givens MD, Waldrop JG. Biosecurity issues associated with current and emerging embryo technologies. *Reprod Fertil Dev*. 2004; 16(1-2):93-102.
- Stringfellow DA, Givens MD. Infectious agents in bovine embryo production: hazards and solutions. *Theriogenology*, 2000; 53:85-94.
- Thibier M. 2008. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer Year. 2007. International Society Embryo Transfer (IETS). Embryo Newsletter.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H, *et al.* Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 2005;63:102–117.
- Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, England GC, Rycroft A, Dobson H *et al.* The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, 2007; 68:549–559
- Williams EJ. Drivers of Post-partum Uterine Disease in Dairy Cattle. *Reprod Dom Anim*, 2013; 48(Suppl. 1): 53–58.
- Williams EJ, Herath S, England GCW, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM : Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. *Animal* 2008; 2(8):1153–1157.
- Wrathall AE. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology* 1995; 43:81-88.
- Wu B, Zan L. Enhance Beef Cattle Improvement by Embryo Biotechnologies. *Reprod Dom Anim*. 2012; 47:865–871
- Yassin AF, Hupfer H, Siering C, Schumann P. Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins *et al.* 1982 emend. Lehen *et al.* 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2011; 61:1265–1274.