

Investigation of uterine microbiota in postpartum dairy cows and barn environment by quantitative PCR technique

Thuong T. Nguyen^{1*}, Nhan T. M. Nguyen¹, Tu T. M. Tran², & Tuan P. V. A. Vo³

¹Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Agriculture and Food Technology, Tien Giang University, Tien Giang, Vietnam

³Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nam Bo Agriculture College, Tien Giang, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: March 24, 2023

Revised: April 10, 2023

Accepted: April 18, 2023

Keywords

Bacteroidetes

Firmicutes

Postpartum dairy cow

Total bacteria

Uterine microbiota

*Corresponding author

Nguyen Thi Thuong

Email:

thuong.nguyenthi@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate uterine microbiota in postpartum dairy cows and barn environment by quantitative PCR and to evaluate the correlation between the microbiota in the uterus and barn environment. The study was carried out in 2 seasons of the year: summer (June to August 2017) and winter (October 2017 to March 2018) on Holstein dairy cow farm, Okayama Livestock Research Institute, Japan. A total of 116 samples, including 68 uterine and fecal samples, were collected from 9 cows in summer and 8 cows in winter, at 1 and 2 months after calving. Additionally, 48 samples of barn environment including airborne dust, bedding, feed and water samples were collected 6 times throughout each season. The quantitative PCR results showed significant differences ($P < 0.05$) in the uterine and fecal microbiota of dairy cows at 1 and 2 months after calving. In summer, total bacteria at 2 months postpartum were higher than those at 1 month after calving, while total bacteria were the same in winter ($P > 0.05$). *Bacteroidetes* and *Firmicutes* in uterus and feces between 1 and 2 months after calving were not significantly different in both summer and winter ($P > 0.05$). The populations of *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and total bacteria were found to be highest in bedding compared to those in feed, airborne dust, and water from the barn environment ($P < 0.05$). *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and total bacteria in uterus were closely related with those in bedding in summer; however, they had the negative correlation with the microbiota of barn environment in winter, especially with fecal microbiota.

Cited as: Nguyen, T. T., Nguyen, N. T. M., Tran, T. T. M., & Vo, T. P. V. A. (2023). Investigation of uterine microbiota in postpartum dairy cows and barn environment by quantitative PCR technique. *The Journal of Agriculture and Development* 22(2), 35-41.

Khảo sát hệ vi sinh vật trong tử cung bò sữa sau sinh và môi trường chuồng nuôi bằng kỹ thuật PCR định lượng

Nguyễn Thị Thương^{1*}, Nguyễn Thị Mỹ Nhân¹, Trần Thị Minh Tú² & Võ Phong Vũ Anh Tuấn³

¹Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Nông Nghiệp và Công Nghệ Thực Phẩm, Trường Đại Học Tiền Giang, Tiền Giang

³Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Cao Đẳng Nông Nghiệp Nam Bộ, Tiền Giang

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 24/03/2023

Ngày chỉnh sửa: 10/04/2023

Ngày chấp nhận: 18/04/2023

Từ khóa

Bacteroidetes

Bò sữa sau sinh

Firmicutes

Tổng vi khuẩn

Vi sinh vật tử cung

*Tác giả liên hệ

Nguyễn Thị Thương

Email:

thuong.nguyenthi@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Với mục tiêu khảo sát hệ vi sinh vật tử cung bò sữa sau sinh và môi trường chuồng nuôi bằng kỹ thuật PCR định lượng và đánh giá mối tương quan giữa hệ vi sinh vật tử cung với môi trường chăn nuôi. Nghiên cứu được thực hiện tại 2 mùa trong năm là mùa hè từ tháng 6 đến tháng 8 năm 2017 và mùa đông từ tháng 10 năm 2017 đến tháng 3 năm 2018 tại Trang trại bò sữa Holstein, Viện nghiên cứu chăn nuôi Okayama, Nhật Bản. Tổng số 116 mẫu, bao gồm 68 mẫu dịch tử cung và mẫu phân được lấy từ 9 con bò vào mùa hè và 8 con bò trong mùa đông ở 2 giai đoạn 1 và 2 tháng sau sinh. Và 48 mẫu môi trường chuồng nuôi gồm mẫu không khí, nền chuồng, thức ăn và nước thu thập tại 6 thời điểm xuyên suốt trong mỗi mùa. Kết quả qPCR khảo sát hệ vi sinh vật tử cung và phân của bò sữa sau sinh ở 1 và 2 tháng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$), trong mùa hè nhận thấy tổng vi khuẩn ở 2 tháng sau sinh cao hơn giai đoạn 1 tháng sau sinh, trong khi đó tổng vi khuẩn này là như nhau trong mùa đông ($P > 0,05$). *Bacteroidetes* và *Firmicutes* trong tử cung và phân không có sự khác biệt trên những con bò sau sinh 1 và 2 tháng trong cả 2 mùa khảo sát ($P > 0,05$). *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn có mật độ cao nhất trong nền chuồng so với thức ăn, không khí và nước uống trong chuồng nuôi ($P < 0,05$). Hệ vi sinh vật *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn trong tử cung tương quan gần với hệ vi sinh hiện diện trong nền chuồng ở mùa hè, tuy nhiên lại tương quan xa và nghịch với hệ vi sinh vật từ các nguồn trong môi trường chuồng nuôi ở mùa đông, đặc biệt là hệ vi sinh vật trong phân.

1. Đặt Vấn Đề

Hệ vi sinh vật tử cung ảnh hưởng đến sự viêm nhiễm và khả năng sinh sản trên bò sữa sau khi sinh (Gilbert & ctv., 2005; Azawi, 2008; Ghanem & ctv., 2015). Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng hệ vi sinh vật tử cung có thể vậy nhiễm từ môi trường chăn nuôi. Nguyên nhân do cỏ và thân tử cung được phục hồi sẽ co lại chậm sau khi sinh (Ghanem & ctv., 2015), đặc biệt trên những bò bị viêm tử cung thì tình trạng này kéo dài hơn trên 2 tháng sau sinh (Griffin & ctv., 1974; Heppelmann & ctv., 2013; Heppelmann & ctv.,

2015). Lớp niêm mạc tử cung có thể phục hồi trong tháng đầu sau sinh, tuy nhiên lớp nội mạc tử cung không thể hồi phục hoàn toàn ở 2 tháng sau sinh (Gautam & ctv., 2009). Chính vì lý do đó, vi khuẩn từ môi trường có nguy cơ tấn công và vậy nhiễm vào tử cung gây viêm tử cung hoặc viêm nội mạc tử cung trên bò sữa sau khi sinh ở giai đoạn 1 và 2 tháng. Trong đó bao gồm các nguồn vậy nhiễm từ phân (Sheldon & Dobson, 2004) hoặc phân vậy nhiễm trực tiếp vào âm hộ (Potter & ctv., 2010), hoặc từ nền chuồng, nước, không khí... Theo nghiên cứu của Santos & Bicalho (2012) ghi nhận đã cho thấy hệ vi

sinh vật tử cung gồm có *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, và *Tenericutes*. Trong đó, *Fusobacteria* và *Bacteroidetes* chiếm đa số trên bề mặt niêm mạc tử cung và được xem là yếu tố nguy cơ tiềm ẩn đối với bệnh này trên bò sau sinh (Bicalho & ctv., 2017). Hệ vi sinh hiện diện trong tử cung ở giai đoạn 1 và 2 tháng sau sinh đóng vai trò quan trọng đối với sức khỏe tử cung. Vì vậy, mục tiêu nghiên cứu này nhằm khảo sát hệ vi sinh vật của tử cung bò sau sinh cũng như sự hiện diện của chúng trong môi trường chuồng nuôi bằng kỹ thuật PCR định lượng. Ngoài ra, thí nghiệm mong muốn tìm ra mối tương quan giữa hệ vi sinh vật tử cung với môi trường chuồng nuôi.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Nội dung nghiên cứu

Khảo sát hệ vi sinh vật của tử cung bò sữa sau sinh và môi trường chuồng nuôi bằng kỹ thuật PCR định lượng, đồng thời tìm ra mối tương quan giữa hệ vi sinh vật của tử cung với môi trường chăn nuôi.

2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Khảo sát được thực hiện tại 2 mùa trong năm là mùa hè từ tháng 6 đến tháng 8 năm 2017 và mùa đông từ tháng 10 năm 2017 đến tháng 3 năm 2018 tại Trang trại bò sữa Holstein, Viện nghiên cứu chăn nuôi Okayama, Nhật Bản.

2.3. Phương pháp thực hiện

Phân bố mẫu

Tổng số 116 mẫu, trong đó có 68 mẫu dịch tử cung và phân được lấy từ 9 bò sau sinh vào mùa hè và 8 con bò sau sinh trong mùa đông ở thời điểm 1 và 2 tháng sau sinh. Các bò để bình thường, không sót nhau. Mẫu dịch tử cung được thu thập bằng dụng cụ cytobrush (Fujihira Industry Co., Tokyo, Nhật Bản) và tuân theo qui trình lấy mẫu của Nguyen & ctv. (2019a). Mẫu phân được lấy trực tiếp từ trực tràng bò, lấy cùng ngày và trên cùng bò lấy mẫu dịch tử cung. Ngoài ra, 48 mẫu môi trường tại chuồng nuôi gồm mẫu không khí, nền chuồng, thức ăn và nước cũng được thu thập ở 2 mùa, mỗi loại mẫu được lấy 6 lần xuyên suốt trong mỗi mùa. Mẫu không khí được thu thập bằng cách đặt 3 đĩa petri ở 3 vị trí trong chuồng, cách nền chuồng 1 m trong vòng 5 phút, sau đó sử dụng 1 mL nước muối sinh lý tiệt

Bảng 1. Phân bố lấy mẫu

Loại mẫu	Mùa hè		Mùa đông		Tổng số mẫu
	1 tháng sau sinh	2 tháng sau sinh	1 tháng sau sinh	2 tháng sau sinh	
Dịch tử cung	9	9	8	8	34
Phân	9		8	8	34
Không khí		6		6	12
Nền chuồng		6		6	12
Thức ăn		6		6	12
Nước		6		6	12

trùng để tráng mỗi đĩa petri và trộn đều 3 đĩa lại, lấy 1 mL dung dịch cho vào tube 1,5 mL. Mẫu nền chuồng cũng được thu thập tại 3 vị trí trên nền, nơi các bò đi lại, nghỉ ngơi, trộn mẫu 3 nơi và lấy đại diện. Mẫu không khí và nền chuồng lấy từ 3 vị trí trong chuồng được xem là đại diện cho hệ vi sinh vật không khí và nền chuồng tại cùng thời điểm lấy mẫu. Mẫu thức ăn và nước uống được lấy tại máng ăn và máng uống của chuồng cùng ngày lấy mẫu. Tất cả mẫu được bảo quản trong thùng đá nhiệt độ 2 – 8°C vận chuyển về phòng thí nghiệm và trữ -20°C cho các phân tích về sau. Qui trình lấy mẫu trên bò tuân theo Qui định của Hội đồng sử dụng và chăm sóc động vật Đại học Okayama, Nhật Bản.

Tổng số mẫu được trình bày qua Bảng 1.

Ly trích DNA

Mẫu dịch tử cung (đầu cytobrush) ngâm trong 1 mL NaCl (0,85%) trong 30 phút. Ly tâm 15.000 vòng/2 phút, rửa bằng 500 µL dung dịch (0,05 M D-glucose, 0,025 M Tris-HCl [pH 8.0] và 0,01 M EDTA [pH 8.0]), ly tâm 15.000 vòng/2 phút, kế tiếp tế bào vi khuẩn được phân giải bởi 180µL dung dịch lysozyme (20 g/L lysozyme, 0,02 M Tris-HCl [pH 8.0], 0,002 M sodium EDTA [pH 8.0], 1,2 g/L Triton X-100) ở 37°C/60 phút. DNA vi khuẩn được tinh sạch bằng kit thương mại DNeasy blood & tissue kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Lấy 250 µL mẫu không khí được cố định trong nước muối sinh lý, mẫu nước và dung dịch xử lý mẫu thức ăn và sử dụng qui trình ly trích DNA tương tự mẫu dịch tử cung. Mẫu phân và mẫu chuồng nuôi sử dụng qui trình ly trích và tinh sạch DNA bằng Kit mini Dneasy stool kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) (Nguyen & ctv., 2019a; Nguyen & ctv., 2019b).

PCR định lượng (Quantitative PCR – qPCR)

2 µL DNA mỗi loại mẫu trong 20 µL hỗn hợp bao gồm 0,2 mM deoxynucleotide triphosphates (dNTPs), 1,2 U polymerase, 1 µM đoạn mồi, 2 mM MgCl₂, 4% dimethyl sulfoxide, 5% glycerol trong 10 mM TE pH 8.0 (Tris-HCl 1 M & 0,5 M EDTA). Qui trình qPCR với một chu kỳ 5 phút 95°C, tiếp theo là 34 chu kỳ ở 15 giây 95°C, 20 giây 60°C, và 30 giây 72°C và thời kỳ kéo dài cuối cùng với 30 giây 80°C. Thực hiện qPCR tổng vi khuẩn với mẫu chuẩn *E. coli* và đoạn mồi là 357 forward, 517 reverse. Thực hiện qPCR *Bacteroides* với mẫu chuẩn *Bacteroides fragilis* và đoạn mồi là *Bacteroides* 934 forward, 1060 reverse. Thực hiện qPCR *Firmicutes* với

mẫu chuẩn *Clostridium coccoides* và đoạn mồi là *Firmicutes* 934 forward, 1060 reverse. Đoạn mồi thiết kế trong qui trình qPCR này sử dụng Sybr green (Nguyen & Nishino, 2021).

2.4. Xử lý số liệu thống kê

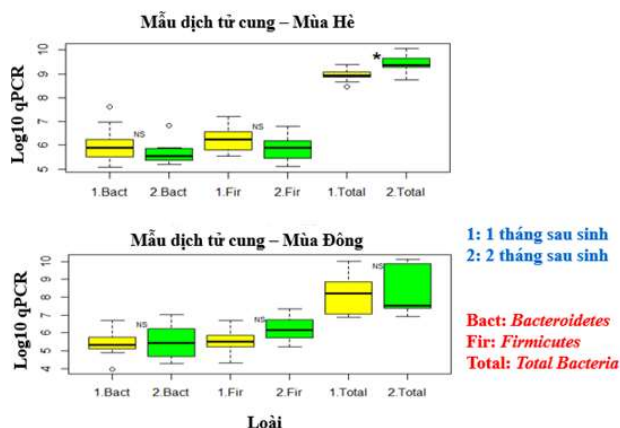
Dữ liệu vi sinh vật từ kết quả qPCR được phân tích phương sai ANOVA one-way bằng Minitab version 16.2 để đánh giá ảnh hưởng theo mùa và thời điểm lấy mẫu (1 và 2 tháng sau khi sinh). Phương pháp PCoA (Principal Coordinates Analysis) phân tích mối tương quan của hệ vi sinh vật chuồng nuôi lên hệ vi sinh vật tử cung bò sau sinh bằng phần mềm R.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Hệ vi sinh vật của tử cung bò sữa và môi trường

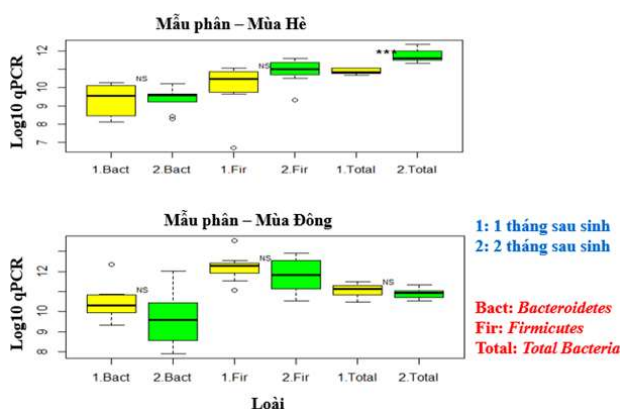
Kết quả qPCR của hệ vi sinh vật *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng số vi khuẩn trong mẫu dịch tử cung trên bò sữa tại thời điểm 1 và 2 tháng sau khi sinh, khảo sát theo mùa được trình bày qua Hình 1. Kết quả cho thấy tổng vi khuẩn ở 1 và 2 tháng sau sinh có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê trong mùa hè ($P < 0,05$), trong khi đó tổng vi khuẩn như nhau trong mùa đông ($P > 0,05$). Tổng vi khuẩn có khuynh hướng tăng lên tại thời điểm sau sinh 2 tháng so với 1 tháng trong mùa hè. Theo Polsky & ctv. (2017), nhiệt độ và ẩm độ cao có thể là yếu tố nguy cơ liên quan đến tình trạng sức khỏe bò, trong đó stress nhiệt làm tăng nguy cơ sinh sản bao gồm cả viêm tử cung và viêm nội mạc tử cung sau sinh do vậy nhiễm vi sinh (Rensis & ctv., 2015).

Bacteroidetes và *Firmicutes* đều hiện diện trong mẫu dịch tử cung không khác biệt tại 2 thời điểm khảo sát sau sinh ở cả 2 mùa ($P > 0,05$). *Bacteroidetes* là một trong hai nhóm vi khuẩn chiếm đa số trên những bò bị viêm tử cung sau sinh và được xem là yếu tố nguy cơ tiềm ẩn góp phần gây bệnh viêm tử cung sau sinh (Bicalho & ctv., 2017). Santos & Bicalho (2012) và Knudsen & ctv. (2016) cũng đã ghi nhận *Bacteroidetes* và *Firmicutes* là 2 trong số các nhóm vi khuẩn gây bệnh liên quan đến viêm tử cung và viêm nội mạc tử cung. Tuy nhiên, khảo sát của Nguyen & ctv. (2019a) đã cho thấy vi sinh vật tử cung ở những bò bình thường sau sinh có 3 nhóm vi khuẩn *Firmicutes*, *Proteobacteria* và *Bacteroidetes* chiếm hơn 90% quần thể vi sinh vật trong tử cung.



Hình 1. *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng số vi khuẩn trong dịch tử cung bò sữa sau sinh 1 và 2 tháng theo mùa (NS: $P \geq 0,05$; *: $P < 0,05$).

Bacteroidetes, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn trong mẫu phân bò sữa sau sinh 1 và 2 tháng theo mùa được trình bày qua Hình 2. Kết quả cũng đã cho thấy không có sự khác biệt về *Bacteroidetes*, *Firmicutes* trong phân bò tại 1 và 2 tháng sau sinh. Tuy nhiên, tổng vi khuẩn cao hơn tại thời điểm 2 tháng sau sinh so với 1 tháng sau sinh trong mùa hè ($P < 0,05$), trong khi mùa đông không có sự khác biệt tại 2 thời điểm này. Khảo sát của Sheldon & Dobson (2004) và Potter & ctv. (2010) đã cho thấy rằng các nguồn vấy nhiễm từ phân, sau đó phân vấy nhiễm trực tiếp vào âm hộ hoặc từ nền chuồng, nước, không khí là các yếu tố nguy cơ gây viêm tử cung trên bò sau sinh.



Hình 2. *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng số vi khuẩn trong phân bò sau sinh 1 và 2 tháng theo mùa (NS: $P \geq 0,05$; ***: $P < 0,05$).

Bacteroidetes, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn trong chuồng nuôi gồm không khí, nền, thức ăn

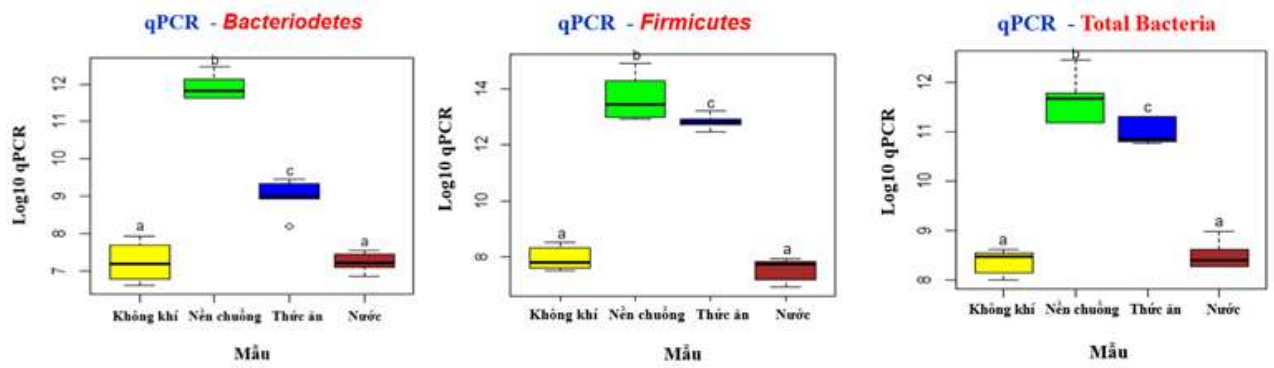
và nước được trình bày trong Hình 3 & 4. Hình 3 cho thấy *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn đều thấp trong mẫu không khí và mẫu nước và mật độ cho thấy không có sự khác biệt ở 2 loại mẫu này ($P > 0,05$). Trái lại, trong mẫu nền chuồng và thức ăn thì mật độ nhóm *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn cao hơn khi so sánh với mật độ trong mẫu không khí và mẫu nước ($P < 0,05$). Nhìn chung, hệ vi sinh vật *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng số vi khuẩn trong mẫu nền chuồng có mật độ cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê với hệ vi sinh trong mẫu thức ăn, không khí và nước ($P < 0,05$). Tuy nhiên, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng số vi khuẩn trong mẫu không khí, nền chuồng, thức ăn và nước phân tích theo mùa không thấy có sự khác biệt ($P > 0,05$) (Hình 4). Kết quả này cho thấy mật độ hệ vi sinh môi trường chuồng nuôi ổn định theo điều kiện môi trường về khí hậu và thời tiết.

3.2. Mối tương quan giữa vi sinh vật tử cung với môi trường chuồng nuôi

Phương pháp PCoA (Principal Coordinates Analysis) phân tích đánh giá mối tương quan của vi sinh vật chuồng nuôi lên vi sinh vật tử cung bò sau sinh được trình bày qua Hình 5. Kết quả cho thấy vi sinh vật *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn trong chuồng nuôi từ không khí, nền chuồng, thức ăn và nước không tương quan gần với vi sinh vật tử cung trên bò sau sinh ở cả mùa hè và mùa đông. Ở mùa hè hệ vi sinh nền chuồng và thức ăn có tương quan gần với hệ vi sinh tử cung; trong lúc đó hệ vi sinh vật phân, không khí và nước có tương quan nghịch với hệ vi sinh tử cung. Ở mùa đông, hệ vi sinh tử cung tương quan xa với hệ vi sinh từ môi trường; hầu như tương quan nghịch, đặc biệt là hệ vi sinh phân. Theo các nghiên cứu cho thấy sự vấy nhiễm từ phân và chuồng nuôi là yếu tố nguy cơ gây viêm tử cung cũng như các bệnh viêm khuẩn đường sinh dục cái (Sheldon & Dobson, 2004; Potter & ctv., 2010). Tuy nhiên, theo Potter & ctv. (2010) thì yếu tố nguy cơ dẫn đến viêm tử cung lại là những tổn thương lớp niêm mạc hay nội mạc tử cung trong quá trình bò sinh đẻ hơn là vấy nhiễm từ phân.

4. Kết Luận

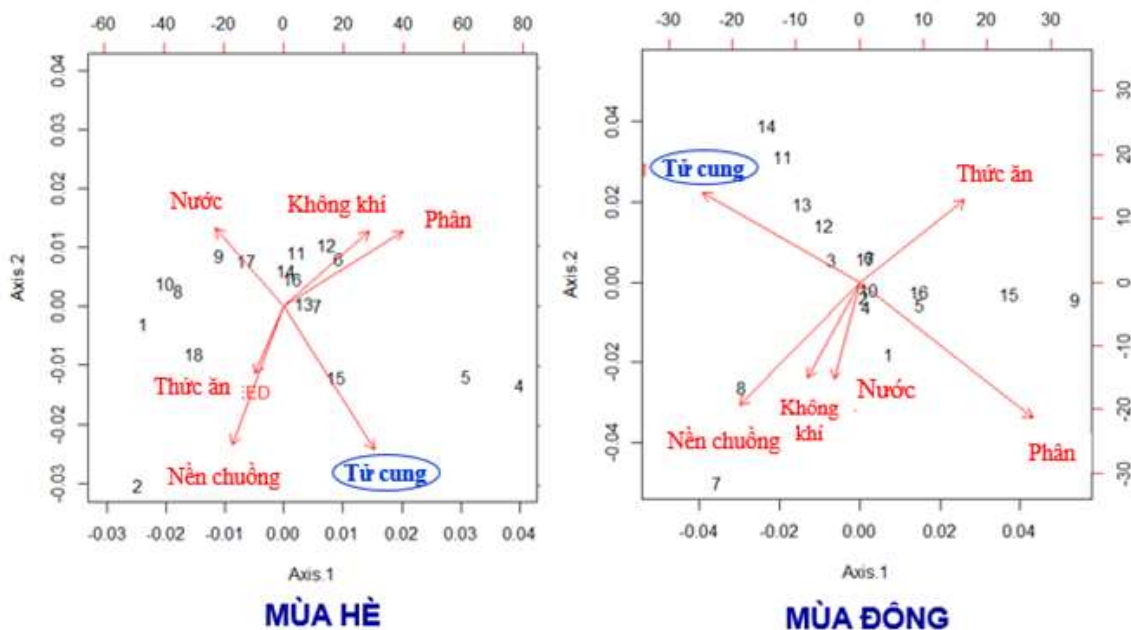
Khảo sát hệ vi sinh vật trong mùa hè đã cho thấy tổng vi khuẩn tử cung, phân của bò sữa



Hình 3. *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng số vi khuẩn (total bacteria) trong chuồng nuôi. (abc thể hiện sự khác biệt giữa hệ vi sinh vật ở các nhóm mẫu $P < 0,05$).



Hình 4. *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng số vi khuẩn (total bacteria) trong chuồng nuôi theo mùa.



Hình 5. Mối tương quan của hệ vi sinh vật chuồng nuôi lên vi sinh vật tử cung bò sau khi sinh.

ở 2 tháng cao hơn giai đoạn 1 tháng sau khi sinh, trong khi tổng vi khuẩn này là như nhau ở mùa đông. *Bacteroidetes* và *Firmicutes* ở tử cung và phân không khác biệt trên bò sau sinh 1 và 2 tháng trong cả 2 mùa. *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn cao nhất trong nền chuồng so với thức ăn, không khí và nước uống. *Bacteroidetes*, *Firmicutes* và tổng vi khuẩn trong tử cung tương quan gần với hệ vi sinh hiện diện trong nền chuồng ở mùa hè, nhưng lại tương quan xa và nghịch với hệ vi sinh vật chuồng nuôi ở mùa đông, nhất là vi sinh vật trong phân.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có bất kỳ mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Azawi, O. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *Animal Reproduction Science* 105(3-4), 187-208. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.01.010>.
- Bicalho, M. L. S., Lima, F. S., Higgins, C. H., Machado, V. S., & Bicalho, R. C. (2017). Genetic and functional analysis of the bovine uterine microbiota. Part I: Metritis versus healthy cows. *Journal of Dairy Science* 100(5), 3850-3862. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12058>.
- Gautam, G., Nakao, T., Yusuf, M., & Koike, K. (2009). Prevalence of endometritis during the postpartum period and its impact on subsequent reproductive performance in two Japanese dairy herds. *Animal Reproduction Science* 116(3-4), 175-187. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.02.001>.
- Ghanem, M. E., Tezuka, E., Devkota, B., Izaike, Y., & Osawa, T. (2015). Persistence of uterine bacterial infection, and its associations with endometritis and ovarian function in postpartum dairy cows. *Journal of Reproduction and Development* 61(1), 54-60. <https://doi.org/10.1262/jrd.2014-051>.
- Gilbert, R. O., Shin, S. T., Guard, C. L., Erb, H. N., & Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64(9), 1879-1888. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.022>.
- Griffin, J. F., Hartigan, P. J., & Nunn, W. R. (1974). Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first 7 week post-partum. *Theriogenology* 1(3), 91-106. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(74\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0093-691x(74)90052-1).
- Heppelmann, M., Krach, K., Krueger, L., Benz, P., Herzog, K., Piechotta, M., Hoedemaker, M., & Bollwein, H. (2015). The effect of metritis and subclinical hypocalcemia on uterine involution in dairy cows evaluated by sonomicrometry. *Journal of Reproduction and Development* 61(6), 565-569. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-015>.
- Heppelmann, M., Weinert, M., Brömming, A., Piechotta, M., Hoedemaker, M., & Bollwein, H. (2013). The effect of puerperal uterine disease on uterine involution in cows assessed by doppler sonography of the uterine arteries. *Animal Reproduction Science* 143(1-4), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.11.003>.
- Knudsen, L. R. V., Karstrup, C. C., Pedersen, H. G., Angen, Ø., Agerholm, J. S., Rasmussen, E. L., Jensen, T. K., & Klitgaard, K. (2016). An investigation of the microbiota in uterine flush samples and endometrial biopsies from dairy cows during the first 7 weeks postpartum. *Theriogenology* 86(2), 642-650. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.016>.
- Nguyen, T. T., Miyake, A., Tran, T. M. T., Tsuruta, T., & Nishino N. (2019a). The relationship between uterine, fecal, bedding, and airborne dust microbiota from dairy cows and their environment: a pilot study. *Animals* 9(12), 1007. <https://doi.org/10.3390/ani9121007>.
- Nguyen, T. T., & Nishino, N. (2021). Investigation of milk microbiota in dairy cows at 1 and 2 months after calving by quantitative PCR. In *Proceedings of The National Conference on Animal and Veterinary Sciences* (655-660). Thua Thien Hue, Vietnam: Hue University Publishing House.
- Nguyen, T. T., Tran, T. M. T., Tsuruta, T., & Nishino, N. (2019b). Stability and variability of the uterine microbiota in postpartum dairy cows. In *Proceedings of The National Conference on Animal and Veterinary Sciences* (181-185). Ho Chi Minh City, Vietnam: Agricultural Publishing House.
- Polsky, L., Marina, A. G., & Keyserlingk, V. (2017). Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science* 100, 8645-8657. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12651>.
- Potter, T. J., Guitian, J., Fishwick, J., Gordon, P. J., & Sheldon, I. M. (2010). Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology* 74(1), 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.023>.
- Rensis, F. D., Isperto, I. G., & Gatiús, F. L. (2015). Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology* 84(5), 659-666. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.021>.
- Santos, T. M. A., & Bicalho, R. C. (2012). Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS One*. 7(12), e53048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053048>.
- Sheldon, I. M., & Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science* 82-83, 295-306. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.006>.