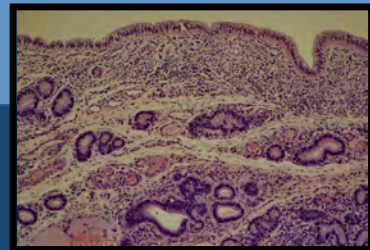
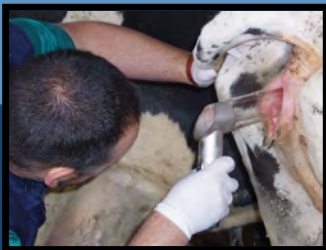


**ENDOMETRITIS SUBCLÍNICAS EN  
GANADO VACUNO LECHERO**





# **ENDOMETRITIS SUBCLÍNICAS EN GANADO VACUNO LECHERO**

**MARCOS VIGO FERNÁNDEZ**

**FECHA: 15 de septiembre de 2016**





Los Drs. D. Luis Angel Quintela Arias, D. Juan José Becerra González,  
y Dña. Mónica Barrio López

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: "Endometritis subclínicas en ganado vacuno lechero", de la que es autor el Licenciado en Veterinaria Don Marcos Vigo Fernández, ha sido realizada en el Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela, bajo nuestra dirección y, en opinión de los abajo firmantes, este trabajo reúne las condiciones legales precisas para optar al Título de Doctor en Veterinaria.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos y sellamos el presente en Lugo, 15 de septiembre de 2016.

Fdo. Luis A. Quintela Arias

Fdo.: Juan J. Becerra González

Fdo.: Mónica Barrio López







*A mi familia*

*A mis amigos*

*Y, a mis compañeros de trabajo*



## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezo todo o apoio brindado polo equipo de investigación do Departamento de Obstetricia e Reproducción da USC durante a etapa docente e de investigación.*

*Agradecementos especiais a Luís Ángel Quintela Arias e Carlos Díaz de Pablo pola súa dedicación e esforzo para o desenvolvemento desta tese e que considero os mentores que encamiñaron a miña carreira profesional.*

*Por outra banda, agradecer os bos momentos que transcorreron cos profesores e compañeiros de máster do Departamento de Patoloxía Animal.*

*E grazas, a Yolanda Trillo por entenderme e animarme en todo momento.*

*A miña familia e amigos.*





<b>ÍNDICE</b>	<b>Pag.</b>
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.- Definición.....	4
2.- Prevalencia.....	6
3.- Etiología.....	8
4.- Factores de riesgo.....	15
5.- Diagnóstico.....	18
6.- Efectos sobre la reproducción y producción.....	23
6.1.- Mecanismos por el que las ensometritis subclínicas afectan a la reproducción.....	25
7.- Tratamiento.....	27
8.- Prevención.....	32
8.1.- Evitar procesos inflamatorios del útero.....	33
8.2.- Favorecer la rápida y completa resolución de los procesos inflamatorios del útero.....	33
8.3.- Favorecer una respuesta inflamatoria adecuada.....	34
8.3.1.- Estrés oxidativo.....	34
8.3.2.- Acidos grasos presentes en la dieta.....	34
9.- Bibliografía.....	35
OBJETIVOS.....	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN/CAPÍTULOS.....	69

1.- CAPITULO 1: Influencia de las endometritis subclínicas en el rendimiento reproductivo de vacas lecheras.....	71
2.- CAPITULO 2: Validación de un método sencillo para la interpretación de las citologías uterinas en la vaca .....	89
3.- CAPITULO 3: Concordancia entre la citología endometrial, la biopsia y la bacteriología, realizadas postmortem, en vacas lecheras eliminadas	101
CONCLUSIONES .....	140
RESUMEN.....	141
RESUMO.....	147
SUMMARY.....	153



## LISTADO DE ABREVIATURAS

**ALAT:** alanina amino transaminasa  
**AMPs:** péptidos antimicrobianos  
**APPs:** proteínas de fase aguda  
**ASAT:** aspartato amino transferasa  
**BCS:** puntuación de la condición corporal  
**BE:** balance energético  
**BEN:** balance energético negativo  
**BHB:**  $\beta$ -hidroxibutirato  
**BoHV:** herpes virus bovino  
**BVDV:** virus de la diarrea vírica bovina  
**DIM:** días en leche  
**DVP:** descarga vaginal purulenta  
**E:** endometritis  
**EC:** endometritis citológica  
**EC:** endometritis clínica  
**ES:** endometritis subclínica  
**FTKb1:** factor de transcripción Kb1  
**IL:** interleukinas  
**M:** metritis  
**MP:** metritis puerperal  
**NEFA:** ácidos grasos no esterificados  
**P:** piómetra  
**PA:** parametritis  
**PAS:** ácido periódico de Schiff  
**PBS:** buffer fosfato salino  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PE:** perimetritis  
**PMN:** polimorfonucleares neutrófilos  
**ROS:** especies reactivas de oxígeno  
**S/C:** servicios por concepción  
**SII:** sistema inmune innato  
**TAG:** triglicéridos



**TLR:** receptores tipo Toll

**TNF $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**US:** ecografía transrectal



## LISTADO DE FIGURAS

Pag.

<b>Figura 1.-</b> Desarrollo del proceso inflamatorio.....	11
<b>Figura 2.-</b> Diferentes eicosanoides y su papel en la regulación de la inflamación.....	12
<b>Figura 3.-</b> La figura combina los resultados de los estudios de Gautan et al. (2010), Quintela et al. (2010) y Quintela (2011) e intenta explicar cómo podemos relacionar las ES con los procesos uterinos en el postparto. Gautan et al. (2010) evidenciaron en su estudio que el 23,6% de las vacas en el postparto presentaban EC (mediante exploración rectal y vaginoscopio), mientras que el resto se mantenían aparentemente sanas. En las vacas con EC comprobaron que el 74,7% se resolvía espontáneamente, persistiendo en el 25,3%, mientras que en las sanas un 10,6% presentaban más adelante una EC. Una de las explicaciones a estas nuevas infecciones es la presencia de ES, no diagnosticadas en este trabajo. En los trabajos de Quintela et al. (2010) y Quintela (2011) el 21,5% de las vacas aparentemente sanas en el postparto, presentaban ES (diagnosticadas mediante citobrush) lo que podría apoyar esta hipótesis. Como se puede ver en la figura, además, las vacas que han tenido y resuelto una EC y las que tienen una EC podrían también evolucionar hacia una ES.....	15
<b>Figura 4.-</b> Mecanismo de acción de los procesos infecciosos/inflamatorios del útero sobre la reproducción. Las bacterias llegan al útero principalmente a través del cérvix. Una vez en el útero, tanto las bacterias como ciertas moléculas asociadas (endo/exo-toxinas) son detectadas mediante los receptores TLR. Se activa entonces el SII, primera barrera frente a la infección. Se liberan citoquinas, que atraen PMN y PGE. Las citoquinas, la PGE y las endo/exo-toxinas actúan en diferentes órganos implicados en la reproducción (Hipotálamo, Hipófisis y ovarios), mientras que las bacterias provocarán destrucción del epitelio mediante apoptosis.....	27
<b>Figura 5.-</b> Intervalo parto concepción basado en la presencia o ausencia de endometritis subclínica.....	81
<b>Figura 6.-</b> Comparación entre la citología endometrial y la histología en función del grado de inflamación.....	112
<b>Figura 7.-</b> Comparación entre la citología endometrial y la histología en función de la distribución del infiltrado .....	113
<b>Figura 8.-</b> Comparación de los resultados de la citología endometrial entre los dos cuernos uterinos.....	114

<i>Figura 9. Comparación de los resultados de la biopsia endometrial entre los dos cuernos uterinos.....</i>	<i>114</i>
<i><b>Figura 10.-</b> Comparación entre los dos cuernos uterinos en función del grado de inflamación endometrial determinada por histología.....</i>	<i>115</i>
<i><b>Figura 11.-</b> Comparación entre los dos cuernos uterinos en función de la distribución del infiltrado determinada por histología.....</i>	<i>116</i>
<i><b>Figura 12.-</b> Microorganismos aislados de los cultivos positivos en función del resultado de la citología.....</i>	<i>117</i>



## LISTADO DE TABLAS

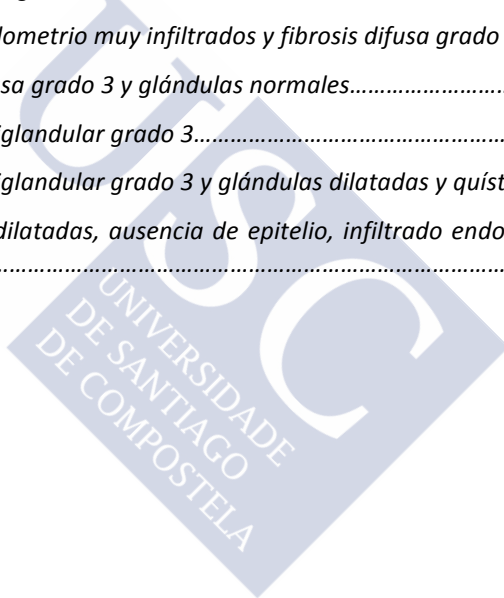
Pag.

<b>Tabla 1.-</b> Incidencia de endometritis subclínicas en función de la semana de postparto en el que se diagnóstica y del punto de corte.....	7
<b>Tabla 2.-</b> Efectos de las endometritis subclínicas (ES) sobre la reproducción descritos en la bibliografía.....	24
<b>Tabla 3.-</b> Resultados del análisis de Kaplan-Meier para los intervalos entre el parto y la concepción y primera inseminación y las inseminaciones/gestación (mediana (intervalo de confianza)).....	79
<b>Tabla 4.-</b> Factores que afectan a las características reproductivas obtenidos mediante el análisis de regresión de (CC = Condición corporal; IC = Intervalo de confianza; HR = Índice de riesgo; PMN = Polimorfonucleares neutrofilos; TAG =Triglicéridos).....	79
<b>Tabla 5.-</b> Puntos de corte correspondientes a los dos métodos de recuento de PMN obtenidos mediante el análisis de Curvas ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic). ABC (área bajo la curva).....	96
<b>Tabla 6.-</b> Clasificación de las lesiones histológicas.....	109
<b>Tabla 7.-</b> Análisis de curvas ROC: La histología endometrial, bacteriología y contenido uterino se evaluaron utilizando la citología como técnica de referencia (punto de corte $\geq 5\%$ PMN en la muestra evaluada al microscopio a 400x) (n=200). (ABC: Área bajo la curva).....	111



## LISTADO DE IMÁGENES

	Pag.
<i>Imagen 1.- Citología negativa.....</i>	129
<i>Imagen 2.- Citología positiva.....</i>	129
<i>Imagen 3.- Epitelio y endometrio normales.....</i>	130
<i>Imagen 4.- Epitelio y endometrio infiltrado.....</i>	130
<i>Imagen 5.- Epitelio normal e infiltrado endometrial difuso y periglandular.....</i>	131
<i>Imagen 6.- Ausencia de fibrosis.....</i>	131
<i>Imagen 7.- Ausencia de fibrosis e infiltrado endometrial abundante.....</i>	132
<i>Imagen 8.- Fibrosis difusa grado 2.....</i>	132
<i>Imagen 9.- Epitelio y endometrio muy infiltrados y fibrosis difusa grado 3.....</i>	133
<i>Imagen 10.- Fibrosis difusa grado 3 y glándulas normales.....</i>	133
<i>Imagen 11.- Fibrosis periglandular grado 3.....</i>	134
<i>Imagen 12.- Fibrosis periglandular grado 3 y glándulas dilatadas y quísticas.....</i>	134
<i>Imagen 13.- Glandulas dilatadas, ausencia de epitelio, infiltrado endometrial y periglandular.....</i>	135







## **ESTRUCTURA**

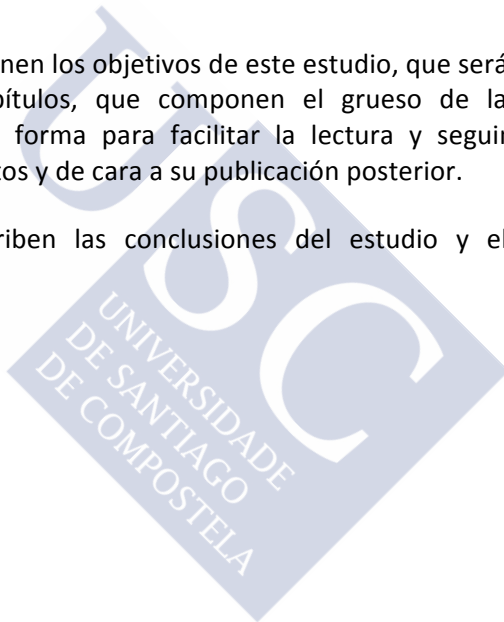




La presente tesis doctoral consta en primer lugar de una Introducción general, que proporciona al lector información sobre el estado actual del conocimiento sobre las endometritis subclínicas en la vaca. Esta información se distribuye en los diferentes apartados que caracterizan una enfermedad: definición, prevalencia, etiología, diagnóstico, efectos negativos, tratamiento y prevención

A continuación se definen los objetivos de este estudio, que serán abordados a lo largo de tres capítulos, que componen el grueso de la tesis. Se ha estructurado de esta forma para facilitar la lectura y seguimiento de los diferentes experimentos y de cara a su publicación posterior.

Por último, se describen las conclusiones del estudio y el resumen en diferentes idiomas.





# **INTRODUCCIÓN GENERAL**





Dentro de un mercado cada vez más globalizado en el que también se encuentran inmersas las explotaciones bovinas, la rentabilidad económica debe jugar un papel prioritario que permita mantener el difícil equilibrio que existe entre obtener un producto de alta calidad y realizarlo con el menor coste de producción posible. Es por ello que en las últimas décadas se ha asistido al nacimiento de nuevos conceptos como el de “eficiencia reproductiva” que persigue maximizar la rentabilidad económica de las explotaciones ganaderas.

Sin embargo, y a pesar de que esta filosofía es clara, se ha producido un descenso paulatino en la eficiencia reproductiva de las explotaciones de vacuno lechero. Así, en un estudio realizado en el año 2003 en el noreste de España, se comprobó que la fertilidad había descendido desde el 42,3% hasta el 33,1% entre los años 1991 y 2000, lo que suponía un descenso anual de casi un 1% (Lopez-Gatius, 2003). Cifras similares fueron descritas por otros investigadores en diferentes partes del mundo (Royal et al., 2000; Lazzari et al., 2011).

En muchos casos este descenso se ha relacionado con cambios en los propios animales, que han conducido a un incremento en su producción de leche (Lucy, 2001; LeBlanc, 2010b; Walsh et al., 2011).

Pero sin duda, uno de los principales factores que han influido en este descenso de la eficiencia reproductiva han sido las patologías uterinas. Así, las metritis y endometritis se han relacionado con retrasos en el reinicio de la actividad ovárica postparto, el incremento del intervalo entre el parto y la primera inseminación, el aumento de los días abiertos, el descenso de la tasa de concepción, el aumento de las tasas de eliminación, etc., (Huszenicza et al.,

1999; LeBlanc et al., 2001; Azawi, 2008; Gautam et al., 2009; Sheldon et al., 2009 y 2010; Priest, 2013).

Por todo ello, en las últimas décadas se han implementado métodos de diagnóstico que han permitido mejorar la detección de estos procesos. Este es el caso de la ecografía transrectal (Kasimanickam et al., 2004; Quintela et al., 2012) y la citología uterina, ampliamente descrita y estudiada por Kasimanickam et al. (2004, 2005b) a principios de este siglo, y que han permitido notables avances en el diagnóstico de estas patologías.

Estas técnicas, han abierto la posibilidad de diagnosticar las endometritis subclínicas y han contribuido a que se desarrollen estudios en los que se aborda esta patología desde múltiples puntos de vista. También han permitido evaluar la relación existente entre este proceso y la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras (Priest, 2013), tanto por su relación con la producción (Cheong et al., 2011), como por los efectos negativos que produce sobre la reproducción (Ricci et al., 2015).

Sin embargo, a pesar del elevado número de estudios publicados en los últimos años, todavía quedan cuestiones relacionadas con la definición, los métodos de diagnóstico y la etiopatogenia que necesitan ser aclaradas.

Por todo ello, este trabajo pretende llevar a cabo una serie de experiencias encaminadas a incrementar el conocimiento de las endometritis subclínicas en ganado vacuno lechero.

## **1.- DEFINICIÓN**

Antes de comenzar a hablar de las endometritis subclínicas es importante situar este proceso dentro del contexto de las patologías uterinas.

Desde el punto de vista histopatológico hablamos de **Endometritis (E)** cuando se produce un proceso inflamatorio que afecta, exclusivamente, al endometrio. Por su parte se conoce como **Metritis (M)** aquellas patologías en las que se ve afectada toda la pared del útero. Finalmente se considera **Perimetritis (PE)** si lo que se ve afectado es la serosa y **Parametritis (PA)** si la inflamación afecta a los ligamentos suspensorios (Kennedy & Miller, 1993; BonDurant, 1999).

Si se tiene en cuenta la enfermedad desde un punto de vista clínico se puede definir la **Metritis puerperal (MP)** como una patología aguda, sistémica, que por lo general tiene lugar en los 10 días posteriores al parto y que se produce como consecuencia de la infección del útero por bacterias (Drillich et al., 2001; Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2006).

Debe tenerse en cuenta que este proceso es sintomatológicamente muy diferente de la **Endometritis clínica (EC)**, que se caracteriza por presentar una descarga purulenta o mucopurulenta a través de la vagina, y que no está acompañada de sintomatología sistémica. Otra diferencia destacable respecto de la MP es que esta afección se produce 21 días o más después del parto (Sheldon & Noakes, 1998; LeBlanc et al., 2002; Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2006).

Por su parte se conoce con el nombre de **Endometritis subclínica (ES)** aquella inflamación del endometrio que no presenta ninguna sintomatología visible de enfermedad clínica. Esta patología se caracteriza por presentar un infiltrado de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) sin exudado (o con una mínima cantidad) acumulado en el útero (Gilbert et al., 1998; Földi et al., 2006; Sheldon et al., 2006).



Finalmente, desde el punto de vista clínico se define la **Piómetra (P)** como el proceso que cursa con un acumulo de material mucopurulento o purulento en el interior del útero, que provoca una distensión del mismo y que coexiste con un cuerpo lúteo en el ovario (Noakes et al., 1990; Sheldon et al., 2006).

Deben ser mencionados también en esta revisión dos términos ampliamente empleados en la actualidad que se basan en los signos observados en su diagnóstico. Por un lado se define la **Descarga vaginal purulenta (DVP)**, como aquella situación en la que se aprecia una descarga purulenta o mucopurulenta a través de la vulva (Dubuc et al., 2010; LeBlanc, 2014). En esta definición se engloban diferentes enfermedades que cursan con esta sintomatología como pueden ser las vaginitis, las cervicitis, las endometritis e incluso las cistitis (Sheldon et al., 2006; LeBlanc, 2014).

Por último, también se describen las **Endometritis citológicas (EC)** que se caracterizan por la presencia de PMN, en porcentaje anormal, en la citología uterina (Dubuc et al., 2010). Por lo tanto, podría referirse tanto a endometritis clínicas como subclínicas.

## **2.- PREVALENCIA**

La prevalencia de las Metritis puerperales (MP) presenta notables variaciones en función del estudio. Así al realizar esta revisión hemos encontrado valores que oscilan entre el 10% descrito por LeBlanc et al. (2002), hasta el 37% citado por Bartlett et al. (1986); Markusfeld (1987) y Peeler et al., (1994).

Variaciones similares han sido observadas en las EC, desde el 12% de Dubuc et al. (2010) hasta el 53% de Gilbert et al. (2005).

Cuando se habla de prevalencia de ES en la vaca es difícil comparar los trabajos publicados, ya que ésta varía en función del momento del postparto en el que

se realiza el diagnóstico, del punto de corte establecido (porcentaje de PMN a partir del cual se considera que un animal presenta ES) y del método utilizado para realizar la citología (cytobrush o lavado).

En la tabla 1 se muestra un resumen de las prevalencias observadas por distintos investigadores en función de los factores mencionados anteriormente.

Cytobrush	Semana de Postparto			Punto de corte
	3ª-5ª	5ª-7ª	7ª-9ª	
<i>Lopdell et al., 2011</i>	35,0%			> 18,0%
<i>Kasimanickam et al., 2004</i>	35,1%			> 18,0%
<i>Heidarpour et al., 2012</i>	13,5%			> 18,0%
<i>Kaufmann et al., 2010</i>	12,4%			> 18,0%
<i>Madoz et al., 2013</i>	21,5%			> 8,0%
<i>Dubuc et al., 2010</i>	19,3%			> 6,0%
<i>Plöntzke et al., 2010</i>	38,0%			> 5,0%
<i>Lopdell et al., 2011</i>		7,0%		> 18,0%
<i>Kasimanickam et al., 2004</i>		34,0%		> 10,0%
<i>Barlund et al., 2008</i>		11,8%		> 8,0%
<i>Madoz et al., 2013</i>		16,0%		> 6,0%
<i>Plöntzke et al., 2010</i>		19,0%		> 5,0%
<i>Madoz et al., 2013</i>			16,0%	> 4,0%
<i>Dubuc et al., 2010</i>			11,1%	> 4,0%
Lavado				
<i>Hammon et al., 2006</i>	51,8%			> 25,0%
<i>Galvao et al., 2009a</i>	38,2%			> 8,5%
<i>Barlund et al., 2008</i>	15,8%			> 8,0%
<i>Cheong et al., 2011</i>		25,9%		> 10,0%
<i>Galvao et al., 2009a</i>		37,2%		> 6,5%
<i>Gilbert et al., 2005</i>		53,0%		> 5,0%

Tabla 1.- Incidencia de endometritis subclínicas en función de la semana de postparto en el que se diagnostica y del punto de corte.

Al revisar todos estos estudios se puede comprobar la gran variabilidad de puntos de corte empleados por los distintos investigadores (del 5 al 25% en las semanas 3ª a 5ª y del 5 al 18% de la 5ª a la 7ª postparto). También se pone de manifiesto diferencias ligadas al método de recogida, ya que los distintos estudios describen una mayor incidencia de ES cuando la muestra es recogida empleando el lavado uterino. Así mismo tiene importancia el momento en el que se realiza el estudio, ya que se produce un descenso de la prevalencia a medida que el postparto avanza.

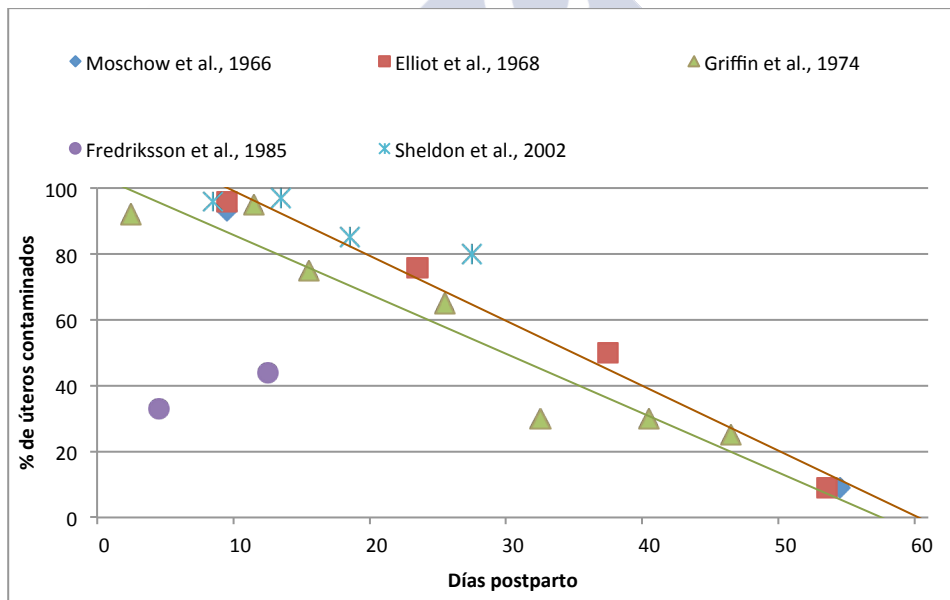
Además, estos artículos sobre la prevalencia evidencian la enorme importancia que las ES tienen en el ganado vacuno de leche, sobre todo en las 7 primeras semanas del postparto.

### **3.- ETIOLOGÍA**

Para hablar de la etiología de las ES debe tenerse muy en cuenta todos los sucesos que tienen lugar en torno al parto y el puerperio, ya que las ES tienen su origen, en muchos casos, en los cambios sufridos por el útero en este periodo.

A lo largo de la gestación el ambiente uterino se encuentra aislado, gracias a que el cuello uterino se encuentra cerrado, por lo que el útero permanece estéril (Földi et al., 2006). Sin embargo, para que se produzca la expulsión del feto en el momento del parto, el cérvix, la vagina y la vulva deben dilatarse para permitir su salida. Debe tenerse en cuenta que, al mismo tiempo, se permite la entrada de microorganismos hacia el interior del útero perdiendo así su condición de esterilidad. El problema se complica ya que el cérvix permanecerá abierto durante unos días (Wehrend et al., 2003), lo que facilita que continúen entrando microorganismos al interior del útero.

Como se puede ver en la gráfica 1, que resume diferentes estudios sobre la contaminación del útero por microorganismos tras el parto (Moschow & Olds., 1966; Elliot et al., 1968; Griffin et al., 1974; Fredriksson et al., 1985; Sheldon et al., 2002), la mayoría de los úteros presentan una elevada contaminación en los días siguientes al parto (hasta los 10-14 días del postparto en la mayoría de las vacas), siendo los microorganismos más comunes: *E. coli*, *Streptococos*, *T. pyogenes*, *B. licheniformis*, *Prevotella spp*, y *F. necrophorum*. La relajación de las barreras físicas que normalmente impiden la entrada de microorganismos y la existencia dentro del útero de un medio de cultivo idóneo para su crecimiento (sangre, restos de tejidos necrosados, etc.) son los responsables de que esto ocurra. Como también se puede apreciar en la gráfica 1, esta contaminación disminuye a medida que avanzamos en el postparto.



Gráfica 1.- Evolución de la contaminación uterina en el postparto según diferentes autores.

Sin embargo, la presencia de contaminación no implica necesariamente el desarrollo de la enfermedad, de no ser así, todas las vacas tendrían metritis en el postparto. La enfermedad se desarrollará sólo cuando los microorganismos existentes se adhieran a las mucosas, colonicen o penetren en el epitelio y/o liberen productos bacterianos (toxinas, enzimas, etc.) (Sheldon et al., 2006). El principal responsable de que esto no ocurra es el sistema inmune innato (SII) de la vaca que se encarga de eliminar la contaminación uterina postparto. En definitiva, en las primeras etapas del postparto se produce una inflamación “fisiológica” que, en condiciones normales, se resolverá a lo largo del primer mes del postparto (Singh et al., 2008).

La intensa actividad del SII en esta etapa se pone de manifiesto por la elevada expresión de genes que codifican diferentes sustancias relacionadas con su actividad (Sheldon, 2004; Chapwanya et al. 2009):

- Receptores tipo Toll (TLR): proteínas que forman parte del SII. Estos receptores reconocen los agentes infecciosos, y estimulan la respuesta inflamatoria.
- Mediadores de la inflamación: Interleukinas (IL1, IL1A, IL6, IL8, IL12A), factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), Factor de transcripción K $\beta$ 1 (FTK $\beta$ 1).
- Moléculas efectoras: Péptidos antimicrobianos (AMPs) y Proteínas de fase aguda (APPs). Sustancias implicadas en la reparación de los tejidos dañados.

Además, a todo esto se suma la llegada de PMN en grandes cantidades. Por lo tanto, en condiciones normales (animal sano) este SII es capaz de eliminar las bacterias y devolver el útero a su estado normal de “esterilidad”.

Por lo tanto, el que se desarrolle una patología uterina depende del balance entre los microorganismos que contaminan el útero, la respuesta inmune del animal y el ambiente (Potter et al., 2010). En consecuencia, todos los factores que alteren este equilibrio favorecerán la aparición de patologías uterinas en el postparto.

Es interesante mencionar que en el proceso de la inflamación se pueden describir cuatro fases: el reconocimiento del agente agresor, la liberación de mediadores de la inflamación, la actuación de los mediadores y la resolución del proceso (Sordillo & Aitken, 2009) (figura 1).

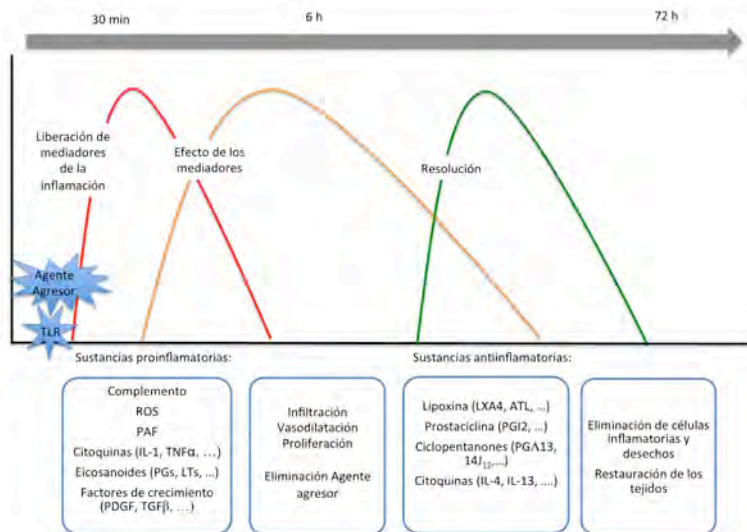


Figura 1.- Desarrollo del proceso inflamatorio.

Debe señalarse que todo el proceso de inflamación uterina se produce en un periodo de tiempo relativamente corto y está regulado, principalmente, por los eicosanoides (Sordillo, 2014). Sin embargo, este proceso puede verse alterado de diferentes formas:

**Prolongación del proceso inflamatorio tras la resolución del problema:** esta situación puede darse cuando se combina una producción exacerbada de eicosanoides inflamatorios y disminuida de antiinflamatorios (figura 2), lo que impedirá la resolución completa y la restauración de la homeostasis en los tejidos afectados (Mattmiller et al., 2013; Sordillo, 2014).

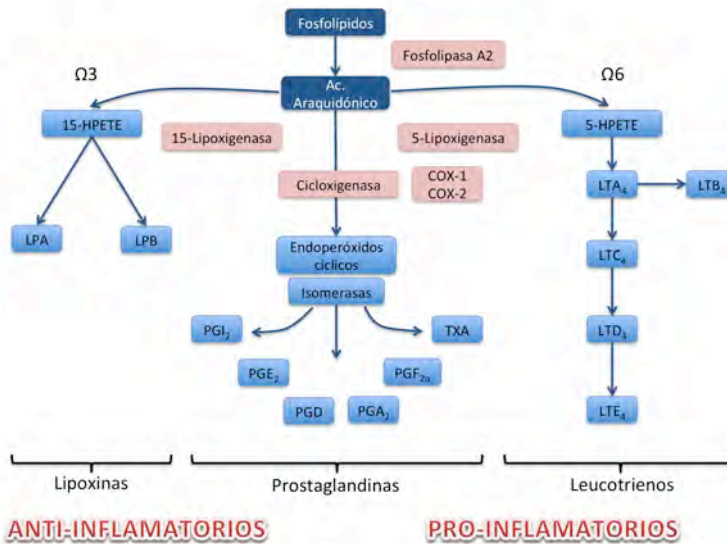


Figura 2.- Diferentes eicosanoides y su papel en la regulación de la inflamación.

No se puede olvidar que el estrés oxidativo es un factor que podría contribuir a que se produzca una respuesta inflamatoria anormal y que el postparto es un periodo de riesgo a este respecto (Miller et al., 1993; Sordillo et al., 2009). Por este motivo, el incremento del metabolismo del oxígeno en el periodo puerperal aumentaría la tasa de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) reduciendo las defensas antioxidantes del animal (Bell, 1995; Gitto et al., 2002; Sordillo et al., 2007, 2009). Diferentes estudios llevados a cabo en células endoteliales bovinas proporcionan evidencias de que el incremento de los niveles de hidroperóxidos lipídicos resultantes del estrés oxidativo, podrían incrementar el fenotipo pro-inflamatorio de estas células (Cao et al.,

2000; Weaver et al., 2001; Sordillo et al., 2005, 2008). Además hay que tener en cuenta que el incremento de las concentraciones de ROS en los tejidos y en las células estaría asociado a la expresión de ciertos genes proinflamatorios como son las moléculas de adhesión endoteliales (Bonomini et al., 2008).

Por último, existen ciertas evidencias de que el nivel de grasa y el tipo de ácidos grasos presentes en la dieta podrían afectar a la función inmune de las células (Salehi et al., 2016). En este sentido, Silvestre et al. (2011a,b) observaron que una dieta rica en ácido linoleico durante el periodo de transición inducía un estado pro-inflamatorio durante las primeras semanas del postparto.

**Inducción del proceso inflamatorio en ausencia de un agente agresor.** En diferentes estudios se ha comprobado cómo el exceso de tejido adiposo y las elevadas concentraciones de NEFA eran factores de riesgo de enfermedades proinflamatorias del postparto en vacas de aptitud láctea (Bernabucci et al., 2005; Goff, 2006; Douglas et al., 2007). Sin embargo, el mecanismo por el que se produce este efecto permanece todavía sin aclarar.

La activación de la respuesta del sistema inmune innato se produce tras el reconocimiento por parte de los receptores tipo toll (TLR) del agente agresor (Sordillo et al., 2009). Existen diferentes TLR, capaces de reconocer a los diferentes agentes agresores. Así, el TLR4 (capaz de reconocer al lipopolisacarido presente en la membrana de las bacterias gram negativas) podría ser activado por ciertos ácidos grasos (laurico, palmítico y oleico) (Sordillo et al., 2009) y, de esta forma, inducir una inflamación sin que exista un agente agresor.

En resumen, las ES podrían ser un proceso inflamatorio del útero, asintomático, originado, probablemente, por una alteración de los procesos



reguladores de la inflamación, bien en su inicio (provocando inflamación sin la existencia de un agente agresor) o bien en su finalización (manteniendo la inflamación durante más tiempo del necesario). Todo esto, estaría estrechamente relacionado con la presencia previa de una inflamación en el útero y con la desproporcionada producción de sustancias anti y pro inflamatorias, situaciones que se dan con frecuencia en el postparto (aunque ocasionalmente podrían suceder en otros momentos).

Por lo tanto, estos mecanismos permitirían explicar las diferentes evoluciones de las ES (figura 3). Tras el parto (primer mes y medio), muchos animales resuelven satisfactoriamente la inflamación/infección que se produce de forma fisiológica, una parte no lo consigue y se establece una EC. Además, otra parte de estos animales eliminaría la contaminación uterina pero no conseguiría resolver adecuadamente el proceso inflamatorio, por lo que se podría desarrollar una ES. Finalmente, las vacas sanas también se podrían reinfectar más tarde y desarrollar una EC que, tras su resolución, podría evolucionar a ES y estos animales con EC podrían curarse totalmente o evolucionar a su vez a una ES (Gautan et al., 2010; Quintela et al., 2010; Quintela, 2011).

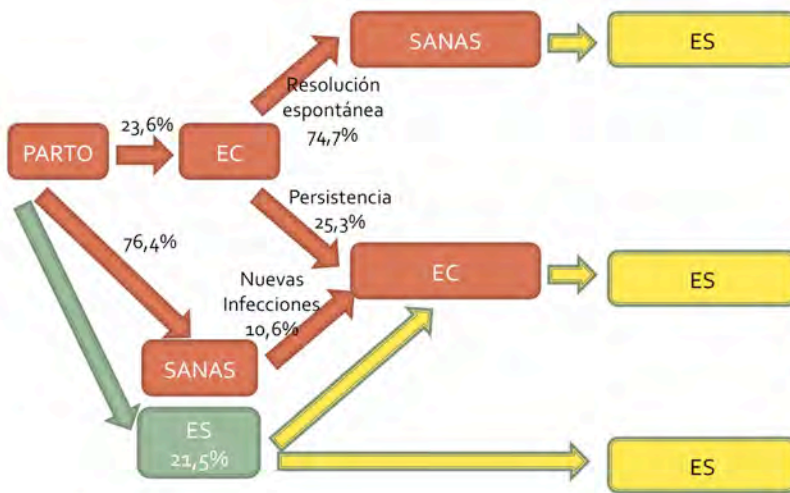


Figura 3.- La figura combina los resultados de los estudios de Gautan et al. (2010), Quintela et al. (2010) y Quintela (2011) e intenta explicar cómo podemos relacionar las ES con los procesos uterinos en el postparto. Gautan et al. (2010) evidenciaron en su estudio que el 23,6% de las vacas en el postparto presentaban EC (mediante exploración rectal y vaginoscopio), mientras que el resto se mantenían aparentemente sanas. En las vacas con EC comprobaron que el 74,7% se resolvía espontáneamente, persistiendo en el 25,3%, mientras que en las sanas un 10,6% presentaban más adelante una EC. Una de las explicaciones a estas nuevas infecciones es la presencia de ES, no diagnosticadas en este trabajo. En los trabajos de Quintela et al. (2010) y Quintela (2011) el 21,5% de las vacas aparentemente sanas en el postparto, presentaban ES (diagnosticadas mediante citobrush) lo que podría apoyar esta hipótesis. Como se puede ver en la figura, además, las vacas que han tenido y resuelto una EC y las que tienen una EC podrían también evolucionar hacia una ES.

#### 4.- FACTORES DE RIESGO

Independientemente de cuál sea la causa que desencadene la Endometritis, desde un punto de vista epidemiológico interesa conocer las circunstancias o condiciones que aumentan la probabilidad de que una hembra bovina la padezca. Así, como ya se ha comentado, actuarán como factores de riesgo todas aquellas situaciones que provoquen un desequilibrio entre los agentes patógenos que contaminan el útero y el SII.

Dado el momento en el que se desarrollan estos procesos, se debe considerar el Balance Energético (BE) como uno de los principales factores de riesgo a tener en cuenta. Es ampliamente conocido que en el inicio de la lactación la vaca sufre un incremento muy importante de las demandas de energía. En un principio la vaca no es capaz de cubrir esas necesidades energéticas tan elevadas debido a que el consumo de materia seca es bajo tras el parto (pudiendo reducirse en algunos animales al 50%) y tarda unos días en aumentar lo suficiente como para cubrir las necesidades. Esto provoca que la vaca entre en un balance energético negativo (BEN).

Sin embargo, a medida que avanza el postparto, la capacidad de ingesta de materia seca de la vaca aumenta hasta llegar a un momento en que las necesidades y el aporte de energía de la dieta se igualan y el balance energético se equilibra. Esta situación es fisiológica y no supone un problema cuando la intensidad y duración del BEN es adecuada. Sin embargo, este fenómeno se puede convertir en un grave problema cuando la intensidad es muy elevada (pérdidas de más de un punto de condición corporal en una escala del 1 al 5) (Shrestha et al., 2005) o su duración se alarga más allá del primer mes postparto (Mcart et al., 2013).

Ya sea el Balance Energético Negativo como tal, ya sea por la elevación de los niveles de  $\beta$ -hidroxibutirato y/o NEFA, y/o por el descenso de la condición corporal que se produce en el postparto temprano, estas situaciones se han relacionado con la alteración de la función de los PMN, con la producción de citoquinas proinflamatorias y con el reconocimiento de las bacterias (Lacetera et al., 2005; Hammon et al., 2006; O'Boyle et al., 2006; Scalia et al., 2006; van Knegsel, 2007; Grinberg et al., 2008; Contreras et al., 2012; Ster et al., 2012). Por lo tanto, parece evidente que el BEN es un factor de riesgo importante en

el desarrollo de enfermedades uterinas en vacas de leche en el postparto ya que reduce las defensas uterinas.

No se puede olvidar que estrechamente relacionado con la producción y con el período de transición están las hipocalcémias, que a su vez están relacionadas, como en el caso anterior, con una alteración de la función de los PMN (Martínez et al., 2012), junto con una alteración de la contracción uterina y, en consecuencia, un retraso en la involución del útero (Bajcsy et al., 2005).

También se describen otro grupo de factores predisponentes relacionados con situaciones en las que se producen lesiones del tracto genital y que pueden favorecer la entrada masiva de microorganismos. Así, se citan los partos asistidos, el nacimiento de mellizos, la aparición de distocias, el nacimiento de terneros muertos, las retenciones de placenta y cualquier otra alteración que puedan ocasionar un mayor o menor estrés en el momento del parto (Priest, 2013).

Por otra parte, también pueden considerarse factores de riesgo de la ES todas aquellas situaciones capaces de alterar la evolución normal de la inflamación como podría ser la alimentación inadecuada (pobre en Omega-3 (Silvestre et al., 2011a y b), deficiencia de antioxidantes (Sordillo et al., 2009) o el excesivo engrasamiento en el momento del parto (Bernabucci et al., 2005; Goff, 2006; Douglas et al., 2007).

Realmente los factores de riesgo de las ES no difieren demasiado de los descritos para las EC (Priest, 2013; Potter et al., 2010). Como ya fue mencionado, es posible que la enfermedad clínica preceda en muchos casos a la subclínica, siendo ésta la causa de que compartan factores de riesgo.

## **5.- DIAGNÓSTICO**

Cuando se habla de diagnóstico de las endometritis es muy importante tener en cuenta las diferencias entre endometritis clínica y subclínica. Parece evidente que dado que la primera presenta una sintomatología clínica será más fácil de detectar. En este caso, los métodos diagnósticos tratan de poner de manifiesto la existencia de contenido purulento/mucopurulento en la luz del útero (inspección de la vulva, mano enguantada, metricheck, vaginoscopio, ecógrafo).

Sin embargo, y aunque a priori parezca sencillo, muchos de los métodos tienen carencias importantes. Desde siempre, se ha asociado la descarga vaginal purulenta con la endometritis clínica. Sin embargo, la presencia de pus en el interior de la vagina podría ser síntoma de otros procesos reproductivos diferentes de la endometritis (cervicitis, vaginitis) o incluso de alteraciones no reproductivas (cistitis, nefritis o pielonefritis) (LeBlanc, 2014).

Así, aquellos métodos basados en la visualización de la descarga purulenta como son la mano enguantada, el metricheck o el vaginoscopio presentan sensibilidades inferiores al 65%, llegando a describirse valores del 15% en el caso del metricheck (de Boer et al., 2014). Tampoco se observa una notable mejoría en cuanto a la especificidad de estos métodos, con valores que oscilan entre el 61% y el 92%, respecto a las tasas de gestación (LeBlanc et al., 2002; Runciman et al., 2009; Dubuc et al., 2010; de Boer et al. en 2014).

Por otro lado, los métodos diagnósticos basados en evidenciar el material purulento en el interior del útero, como puede ser la ecografía transrectal, permiten visualizar contenido en el interior del útero (Quintela et al., 2006). Sin embargo, los criterios tradicionalmente empleados para diagnosticar una endometritis por este sistema se basan en determinar la presencia de

contenido, determinar el espesor del endometrio y evaluar el diámetro del cérvix y de los cuernos uterinos (Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008; Meira et al., 2012), pero sin entrar a valorar el tipo de contenido. Por lo tanto, cuando sólo se tiene en cuenta la presencia o ausencia de fluido en la luz de útero y el espesor del endometrio, es posible confundir a los animales que padecen este proceso con hembras que se encuentren en estro, ya que la única diferencia entre ambas situaciones es el tipo de contenido (Quintela et al., 2012; Murillo et al., 2014). Por otra parte, debemos tener en cuenta que emplear el tamaño del cérvix y/o de los cuernos uterinos puede ser bastante ambiguo debido a la enorme variabilidad existente entre individuos.

En lo que respecta a la ES los métodos basados en la inspección del periné y vulva, como son la mano enguantada, el metricheck o el vaginoscopio, no tienen utilidad, ya que estos animales no presentan secreciones. Así, los métodos descritos para diagnosticar este proceso son la ecografía, la citología endometrial y, en menor medida, la biopsia uterina. Además, en la actualidad, se considera la citología endometrial como la técnica “gold estándar” de esta patología (Kasimanickam et al., 2004; Prieto et al., 2012).

Si se tiene en cuenta la definición de ES como el proceso inflamatorio del endometrio en el que no aparece exudado (o una mínima cantidad) en el interior del útero, es fácil comprender que la citología sea la prueba definitiva, mientras que la ecografía sólo permita el diagnóstico de algunos casos.

En estudios realizados por Kasimanickam et al. (2004), Barlund et al. (2008) y Meira et al. (2012) en los que se comparaba la eficacia en el diagnóstico de las ES de la ecografía y de la citología endometrial, se observó que la sensibilidad de la ecografía era baja (a pesar de que la especificidad era elevada) lo que

indicaba que los diagnósticos de ES por este procedimiento eran poco fiables, probablemente porque al valorar simplemente la presencia de líquido en el endometrio y el diámetro del útero, era fácil realizar diagnósticos erróneos.

Sin embargo, en los últimos años se ha empezado a emplear la ecografía Doppler en el diagnóstico de las endometritis en ganado vacuno. Debertolis et al. (2015) apreciaron un notable incremento del flujo vascular en las arterias uterinas en animales a los que se les había provocado una endometritis. Estos trabajos podrían suponer un notable avance en el empleo de la ecografía en el diagnóstico de este proceso.

A pesar de estos avances, hoy por hoy la citología sigue siendo el método diagnóstico de referencia para las ES. Si bien, aún existen notables discrepancias sobre el método de toma de muestras y el punto de corte a utilizar.

Respecto al método de toma de muestra, en la actualidad se describen dos sistemas principales que son el lavado uterino y el empleo del cytobrush. Kasimanickam et al. (2005b) realizaron un estudio comparativo entre ambas técnicas llegando a la conclusión de que el cytobrush era mejor que el lavado uterino por ser más rápido (independiente del tamaño del útero), prácticamente no producía irritación a nivel del endometrio, producía una menor distorsión de las células y menor presencia de glóbulos rojos. Sin embargo, este sistema sólo proporcionaba información de una zona concreta del útero, al contrario del lavado uterino que recogía información de todo el útero.

En lo que se refiere al punto de corte a emplear para decidir si un animal presenta, o no, esta patología, es imprescindible tener en cuenta los días de postparto en los que se realiza la toma de muestra. No se puede olvidar que durante el primer mes del postparto el proceso de involución uterina favorece

la migración de PMN hacia la luz del útero (Sheldon, 2004; Chapwanya et al. 2009) y por lo tanto el punto de corte deberá ser más alto. Así, cuando se emplea el cytobrush se han propuesto valores entorno al 18% por la mayor parte de los autores (Kasimanickam et al., 2004; Kaufmann et al., 2010; Lopdell et al., 2011; Heidarpour et al., 2012). Sin embargo, cuando la muestra se toma a partir del día 30 de postparto, el proceso de la involución uterina habrá finalizado en la mayoría de los animales, por lo que el punto de corte debe ser más bajo, estableciéndolo la mayor parte de los investigadores entorno al 5-10% (Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008; Plöntzke et al., 2010; Madoz et al., 2013).

Por otra parte, cuando se habla de citologías realizadas mediante lavados uterinos, encontramos una gran variación en los puntos de corte empleados por los distintos investigadores. Así, la mayor parte de los estudios establecen valores entre el 5% y el 25% (Gilbert et al., 2005; Hammon et al., 2006; Barlund et al., 2008; Galvao et al., 2009b; Cheong et al., 2011).

Por último, otro posible factor de variación a tener en cuenta a la hora de interpretar una citología uterina, es el momento del ciclo estral en el que se encuentra el animal. Es necesario recordar que durante la fase folicular del ciclo aumenta el infiltrado de PMN en el endometrio, por el efecto de los estrógenos (Ohtani et al., 1993). Este hecho, de no ser tenido en cuenta, podría dar lugar a falsos positivos. Sin embargo, trabajos recientes señalan que el resultado de la citología (realizada mediante cytobrush) no variaría a lo largo del ciclo estral (Madoz et al., 2013).

Una nueva alternativa para poner de manifiesto altos porcentajes de PMN en el útero de forma rápida, es el empleo del test de orina (leukocyte esterase test) (Cheong et al., 2012; Couto et al., 2013). Se trata de un test colorimétrico



que muestra una correlación variable con la citología uterina. Santos et al. en el año 2006 le otorgaban una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98%. Sin embargo, Cheong et al. (2012) tan sólo observaron una sensibilidad del 77% y una especificidad del 52%. De todas formas, su empleo en granjas comerciales no es muy frecuente, probablemente por la ausencia de un test desarrollado exclusivamente para su uso en útero.

Por último, debe mencionarse la biopsia uterina. Esta técnica es empleada rutinariamente en humanos para el estudio de la infertilidad y es la técnica de referencia para la evaluación del endometrio en la mujer (Strowitzki et al., 2006).

En animales domésticos, la biopsia uterina se viene realizando en yeguas desde los años 60 como método para investigar los problemas de infertilidad (Brandt & Manning, 1969), siendo hoy un método rutinario para su diagnóstico (Nielsen, 2005). Sin embargo, su uso en granjas comerciales de ganado vacuno es muy reducido y sólo se emplea en investigación. Posiblemente sea debido a la mayor dificultad de la toma de la muestra, la necesidad de emplear más tiempo en su procesado, así como de contar con personal cualificado (Nielsen, 2005) y, principalmente, el miedo a que esta prueba tenga un efecto negativo sobre la fertilidad (Zaayer & van der Horst, 1986).

Debido a esto, los estudios llevados a cabo utilizando la biopsia de útero como método de diagnóstico de las ES en el ganado vacuno son muy reducidos (de Boer et al., 2014).

A pesar de todo lo expuesto, esta sobradamente demostrado su valor diagnóstico en los procesos inflamatorios del útero (Manspeaker & Haaland, 1983; Bonnet et al., 1991). En el trabajo de Meira et al. (2012), en el que se empleaba la citología como técnica diagnóstica de referencia, la biopsia

uterina demostró una sensibilidad del 78% y una especificidad del 81%, con una concordancia moderada y un valor de Kappa del 48% (cuando se tenía en cuenta únicamente el aspecto del epitelio, la lamina propia y los vasos), reduciéndose este valor si se tenía también en cuenta el aspecto de las glándulas endometriales. Además, en el trabajo de Madoz et al. (2014), en el que únicamente se valoraba el grado de infiltración del endometrio, la concordancia era escasa, con un valor de Kappa de tan solo un 15%. Sin embargo, estos valores deben tomarse con cuidado ya que el número de muestras con ES o EC era muy reducido (4 y 6 respectivamente).

Por lo tanto, y a falta de más estudios comparativos, se podría concluir que la biopsia uterina parece un método muy específico para detectar la inflamación y las lesiones en el útero (Meira et al., 2012), sin embargo, por su complejidad en la especie bovina, se podría considerar que la citología endometrial sería una buena alternativa a esta técnica.

## **6.- EFECTOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN Y PRODUCCIÓN**

Los efectos negativos sobre la reproducción de las endometritis clínicas son de sobra conocidos y han sido descritos en numerosos trabajos a lo largo de los años: descenso en la fertilidad, incremento de días abiertos y de las tasas de eliminación (LeBlanc et al., 2002; Gautam et al., 2009; Gautam et al., 2010; Marques et al., 2015). Fourichon et al. en el 2000 realizaron un meta-análisis empleando 23 trabajos sobre endometritis y determinaron que las vacas con esta patología uterina aumentaban en 15 días los días abiertos, mientras que disminuía un 16% su fertilidad.

Sin embargo, cuando se habla de ES aparecen algunas discrepancias, encontrando desde algunos autores que no aprecian ningún efecto negativo

sobre la reproducción (Plöntzke et al., 2010) a muchos otros que describen numerosas implicaciones negativas sobre la fertilidad (tabla 2).

Parámetro reproductivo	Impacto ES	Referencias
Anestro postparto	Aumenta	Gilbert et al. (2005); Burke et al. (2010); Green et al. (2011); McDougall et al. (2011).
Tasa de gestación 1ª IA	Disminuyen	Gilbert et al. (2005); Barlund et al. (2008); McDougall et al. (2011); Barrio et al. (2014)
Inseminaciones/gestación	Aumentan	Gilbert et al. (2005); Barlund et al. (2008)
Días abiertos	Aumentan	Kasimanickam et al. (2004); Gilbert et al. (2005); Barlund et al. (2008); McDougall et al. (2011)
Tasa de gestación	Disminuyen	Kasimanickam et al. (2004); Gilbert et al. (2005); Barlund et al. (2008); Dubuc et al. (2010); McDougall et al. (2011).
% embriones transferibles	Disminuye	Drillich et al. (2012); Fernández et al. (2014)

Tabla 2.- Efectos de las endometritis subclínicas (ES) sobre la reproducción descritos en la bibliografía.

Debido a todas las implicaciones reproductivas propuestas, las ES también han sido relacionadas con el síndrome de repetición de celos en la vaca (Pérez-Marín et al., 2012). Sin embargo, debe señalarse que el número de estudios que consideran esta relación es escaso y los resultados variables. Mientras que en algunos trabajos se describen prevalencias muy elevadas (próximas al 50%) de ES en vacas con síndrome de repetición de celos (Salasel et al., 2010; Janowski et al., 2013), en otros la prevalencia encontrada es relativamente baja (< 15%) (Pothmann et al., 2015), aunque, es necesario indicar que los puntos de corte utilizados, del porcentaje de PMN, son diferentes en cada caso (entre el 3% y el 10%).

Finalmente, hay que mencionar que las endometritis, además de los importantes efectos sobre la reproducción, afectan negativamente a la

producción de leche (Bell & Roberts, 2007). Este efecto ha sido descrito tanto en las endometritis clínicas como en las subclínicas (Green et al., 2009; Burke et al., 2010; McDougall et al., 2011). Así, se ha relacionado la presencia de estos procesos con descensos de la producción láctea (de 0,6 a 1,03 Kg/vaca/día), disminución del porcentaje de grasa y proteína y el incremento en el recuento de células somáticas (Green et al., 2009; Burke et al., 2010; McDougall et al., 2011). Desgraciadamente, en la actualidad este tema aún no está totalmente aclarado ya que existen ciertos trabajos que contradicen estas afirmaciones (Dubuc et al., 2011).

#### **6.1- MECANISMO POR EL QUE LAS ENDOMETRITIS SUBCLÍNICAS AFECTAN A LA REPRODUCCIÓN (figura. 4)**

Existe un amplio consenso que indica que en el caso de las endometritis clínicas la presencia de microorganismos en el interior del útero justificaría, en gran parte, dichos efectos, ya que los gérmenes podrían provocar daños directos sobre el endometrio (Herath et al. 2007; Williams et al. 2007).

Pero además muchos gérmenes tienen la capacidad de producir endo y exotoxinas que pueden ejercer un efecto a distancia. Así por un lado podrían afectar a la producción de hormonas (estrógenos y progesterona) lo que podría alterar el desarrollo folicular y a la formación y normal desarrollo del cuerpo lúteo (Herath et al., 2007; Williams et al., 2007; Shimizu et al., 2012). Pero también podrían afectar a la producción de LH, lo que conllevaría alteraciones en la ovulación (Coleman et al., 1993; Lavon et al., 2008; Lavon et al., 2010) o incluso podrían incrementar la producción de PGE<sub>2</sub>, que a su vez afectaría a la supervivencia del cuerpo lúteo (Herath et al. 2009). Finalmente,

también se ha descrito que esas endo y exotoxinas podrían influir en el normal desarrollo embrionario pudiendo reducir su supervivencia (Soto et al., 2003).

Sin embargo, cuando se habla de ES, debe señalarse que, en la mayoría de los casos, la presencia de microorganismos en la luz del útero es muy escasa, pareciéndose más a la de las vacas sanas que a la de las vacas con EC o metritis (Lazzari et al., 2011; Madoz et al., 2014; Mariño et al., 2015). Por lo tanto, parece que el proceso inflamatorio cobraría especial importancia en la patogenia del proceso.

En síntesis, Las ES serían debidas a una alteración del proceso inflamatorio que persistiría en el tiempo (más allá de lo que se podría considerar normal o fisiológico) en ausencia, en la mayoría de los casos, del causante de la misma que ya habría sido eliminado. Como consecuencia de esta inflamación, se liberarían una serie de mediadores como son el factor de necrosis tumoral y diversas interleukinas (Kasimanickam et al., 2013). Estas sustancias, parece que podrían tener efectos negativos sobre la reproducción, actuando a diferentes niveles. Por un lado se apreciaría un efecto sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis, lo que provocaría una reducción de la secreción de LH y FSH (Rivest et al., 1993). Pero por otro lado, también se podría describir un efecto sobre el ovario, ya que intervendrían en la foliculogénesis, ovulación, luteinización y luteolisis (Sakumoto et al., 2003; Neuvians et al., 2004; Sakumoto & Okuda, 2004; Field et al., 2013; Galvao et al., 2013). Finalmente, también se ha descrito un efecto directo sobre el embrión, lo que reduciría su viabilidad y, en consecuencia, las tasas de concepción (Hill & Gilbert, 2008; Drillich et al., 2012; Fernández et al., 2014).

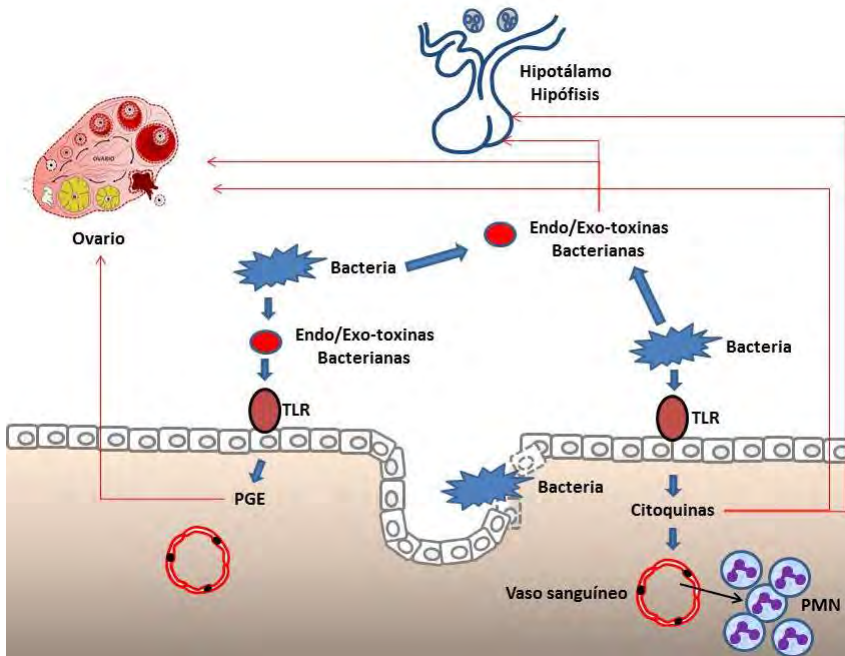


Figura 4.- Mecanismo de acción de los procesos infecciosos/inflamatorios del útero sobre la reproducción. Las bacterias llegan al útero principalmente a través del cérvix. Una vez en el útero, tanto las bacterias como ciertas moléculas asociadas (endo/exotoxinas) son detectadas mediante los receptores TLR. Se activa entonces el SII, primera barrera frente a la infección. Se liberan citoquinas, que atraen PMN y PGE. Las citoquinas, la PGE y las endo/exo-toxinas actúan en diferentes órganos implicados en la reproducción (Hipotálamo, Hipófisis y ovarios), mientras que las bacterias provocarán destrucción del epitelio mediante apoptosis.

## 7.- TRATAMIENTO

Desde el momento de su primera descripción hasta la actualidad, se han postulado numerosas opciones terapéuticas tanto para las endometritis clínicas como para las subclínicas en el ganado vacuno, algunas de las cuales pasamos a describir someramente:

**N-acetilcisteína:** este fármaco con propiedades mucolíticas ha sido más investigado en yeguas (Witte et al., 2012; Gores-Lindholm et al., 2013; Melkus et al., 2013) que en vacas (Tras et al., 2014). Su empleo está más encaminado

al tratamiento de las endometritis clínicas. Debe tenerse en cuenta que el contenido uterino en las EC y la formación de biofilms por parte de algunas bacterias podría interferir en la farmacocinética y farmacodinámica de los agentes bacterianos, haciéndolos ineficaces y facilitando la cronificación del proceso (Tras et al., 2014). La N-acetilcisteína tiene un efecto mucolítico importante, lo que reduce la viscosidad del moco uterino (Witte et al., 2012), pero además posee propiedades antioxidantes (Duru et al., 2008) y antimicrobianas (Cederlund & Mardh, 1993) por lo que dificulta la formación de biofilms y el crecimiento de algunos microorganismos (Pérez-Giraldo et al., 1997). Es por esto que el empleo de esta sustancia, combinada con antibióticos, podría resultar eficaz en el tratamiento de estos procesos. Concretamente, en el estudio de Tras et al. (2014), se apreciaba un porcentaje de curación del 83% cuando los animales eran tratados con N-acetilcisteína junto con amoxicilina y ácido clavulánico, frente al 55% del grupo control de individuos no tratado.

**Ozono:** es otra alternativa terapéutica que se está estudiando para el tratamiento de las endometritis en el ganado vacuno. Es una molécula compuesta por 3 átomos de oxígeno (O<sub>3</sub>). Entre sus propiedades se describe el tener un efecto bactericida (Silva et al., 2009), ser estimulante del sistema inmune (Zimran et al., 2000) y tener un importante poder antiinflamatorio (Guennadi et al., 2008). Parece que todos estos efectos lo harían más eficaz que otros antisépticos utilizados tradicionalmente como es el caso del Yodo (Bocci, 1996; Silva et al., 2009). En un reciente estudio realizado por Polat et al. (2015) se comprobó que los parámetros reproductivos de vacas con EC eran similares en el grupo de animales tratado con ozono intrauterino que en el grupo tratado con antibióticos, llegando a la conclusión de que podría ser una alternativa interesante a estos. Además, también se ha comprobado un efecto

positivo en las vacas que presentaban retención de placenta (Zobel & Tkalic, 2012) e incluso su uso como preventivo de alteraciones uterinas en el postparto temprano (Djuricic et al., 2012).

**Dextrosa:** el empleo de este monosacárido en el tratamiento de las endometritis surge de la demostración in vitro del efecto bactericida de las soluciones hipertónicas de azúcar (Chirife et al., 1983). Su eficacia en el tratamiento de las endometritis se ha comprobado en varios trabajos recientes, en los que la administración intrauterina de dextrosa incrementaba el porcentaje de curaciones (Brick et al., 2012; Haan, 2014; Machado et al., 2015), aunque esto no siempre implica una mejora en los parámetros reproductivos (Machado et al., 2015).

**Lavado uterino con solución salina o similares:** la utilidad de los lavados del útero ha sido sobradamente demostrada en el caso de la yegua (Hurtgen, 2006; Liu & Troedsson, 2008), en la que se utiliza con frecuencia en el tratamiento de las inflamaciones uterinas. Su efecto se debe a la eliminación del contenido inflamatorio del útero (PMN no funcionales y otros productos de la inflamación) y a que favorece la aparición de contracciones uterinas que facilitan el vaciado del útero (Brinsko et al., 2011). Además, la eliminación de los PMN no funcionales facilita el remplazo por PMN funcionales capaces de seguir luchando contra la infección (Brinsko et al., 1990). Por su parte, en ganado vacuno se ha descrito su posible utilidad en el tratamiento de vacas con síndrome de repetición de celos, ya sea solo, o combinado con prostaglandinas y/o antibióticos (Ahmadi & Dehghan, 2007; Reddy et al., 2012), partiendo del supuesto de que uno de los principales problemas de estas vacas son las endometritis crónicas (Ahmadi & Dehghan, 2007). En el caso de ES en el postparto, el lavado uterino ha demostrado su eficacia en la



reducción del porcentaje de PMN 10 días después, aunque no se comprobó si se producían mejoras de las tasas de gestación postratamiento (Dini et al., 2015).

**Antibióticos y Prostaglandinas juntos o por separado:** ambos tratamientos serán incluidos en el mismo apartado debido a que son los agentes terapéuticos más ampliamente utilizados y, en muchas ocasiones, se han combinado. Prueba de esto son los trabajos de Haimerl et al. (2012) y de Lefebvre & Stock (2012) en los que se revisan todos los estudios en los que se utilizan prostaglandinas o antibióticos en el tratamiento de las endometritis en las últimas 4 décadas. El primero (Lefebvre & Stock, 2012) se centra en las experiencias en que emplean como agente terapéutico a las prostaglandinas. Tras analizar 68 trabajos (de los que tan solo 37 cumplían con los requisitos suficientes para ser tenidos en cuenta) los autores observan que, únicamente, 6 trabajos aprecian un efecto positivo, significativo, tras la administración de prostaglandinas en vacas con EC. El segundo estudio (Haimerl et al., 2012) revisaba experiencias en las que se utilizaban tanto prostaglandinas como aquellas en que se empleaban antibióticos. En este caso, de 294 artículos iniciales, solo 9 cumplían con los requisitos y la conclusión final es que no encontraban evidencias de que el uso de prostaglandinas en las endometritis postparto pudiera ser beneficioso. Por su parte, el único antibiótico que parecía ser efectivo es la Cefapirina.

Al contrario que en las EC, existen pocos trabajos sobre el empleo de estos tratamientos en ES, en parte, por ser más reciente la descripción de este proceso. Estos estudios son difíciles de comparar debido a las enormes diferencias existentes entre ellos. Por un lado emplean diferentes puntos de corte, además de emplear diferentes protocolos de inseminación e involucrar a animales en diferentes momentos del postparto. Teniendo esto en cuenta,

de los 5 trabajos existentes, en tres se prueban las cefalosporinas (Kasimanickam et al., 2005; Galvao et al., 2009b; Denis-Robichaud & Dubuc, 2015) y en otros tres las prostaglandinas (Kasimanickam et al., 2005; Galvao et al., 2009a; Lima et al., 2013). Así, las cefalosporinas mostraban un efecto positivo sobre la fertilidad en la primera inseminación artificial postparto en dos de ellos (Kasimanickam et al., 2005; Denis-Robichaud y Dubuc, 2015) mientras que no se apreciaba ningún efecto sobre la reproducción en el otro (Galvao et al., 2009b). Por su parte, en el caso de las prostaglandinas ocurría algo similar, no parecía afectar a la eficacia reproductiva en uno de los estudios (Lima et al., 2013), mientras que se describían mejoras de los parámetros reproductivos en los otros dos (Kasimanickam et al., 2005; Galvao et al., 2009a).

Por otra parte, es necesario tener en cuenta que la magnitud del efecto positivo observado en algunos de estos trabajos dependía de otros factores como: la actividad ovárica postparto (siendo mucho menor el efecto en vacas en anestro) (Denis-Robichaud & Dubuc, 2015) o de la condición corporal (siendo mayor el efecto en vacas con una condición corporal baja en el postparto) (Galvao et al., 2009a). En definitiva, dado el escaso número de trabajos, la gran variedad de protocolos utilizados y la diversidad de resultados, no se puede concluir que estos tratamientos sean realmente efectivos en las ES.

**Antiinflamatorios no esteroideos (AINES):** dado los resultados poco concluyentes obtenidos con otros tratamientos, en las últimas décadas se ha abierto una nueva vía de investigación que contempla el empleo de los AINES. Ya que, en muchos casos de ES no existe contenido en el útero, ni cultivo uterino positivo, los antibióticos y prostaglandinas podrían no mostrar efectos

positivos, como se ha visto en el apartado anterior. Sin embargo, dado que existe un cuadro inflamatorio que muy probablemente sea el responsable de los efectos negativos de las ES (Barański et al., 2012), el empleo de los AINES podría estar plenamente justificado. Debe recordarse que estos agentes son el tratamiento más utilizado en las inflamaciones (Paksoy & Das, 2013). Debido a ello los AINES se emplean desde hace tiempo en la transferencia de embriones para evitar los problemas derivados de la manipulación del útero durante la transferencia a la receptora (Elli et al., 2001; Schrick et al., 2001). También en la yegua para evitar la bajada de fertilidad posterior a las inflamaciones uterinas (Rojer & Aurich, 2010). Esto hace pensar que estas sustancias podrían jugar un papel beneficioso en el tratamiento de las ES (Priest, 2013; Priest et al., 2013). En estos estudios se demostró que la administración de AINES en el postparto, en vacas con ES, mejoraba la fertilidad posterior. Sin embargo, ninguna de las experiencias realizadas ha podido comprobar la reducción de la incidencia de la ES tras el tratamiento (Priest, 2013; Priest et al., 2013; Meier et al., 2014).

**Otros:** es importante mencionar que se han probado otros tratamientos, aunque sólo en EC, con muy pocas o ninguna réplica de los mismos y con resultados variables, por lo que sus posibles aplicaciones en las ES son, actualmente, dudosas. Estos tratamientos consisten en: la administración de bacterias lácticas (Deng et al., 2015); enzimas proteolíticas (Drillich et al., 2005) o Lipopolisacárido de *E. coli* (Sing et al., 2000) en el interior del útero

## 8.- PREVENCIÓN

Dado que la ES se trata de una alteración en la respuesta inflamatoria del útero, la prevención debería de ir encaminada a evitar los procesos

inflamatorios del útero, favorecer la rápida y completa resolución de los mismos y favorecer que se produzca una respuesta inflamatoria adecuada.

8.1.- Evitar los procesos inflamatorios del útero. Como ya se ha comentado, la ruptura del equilibrio entre la entrada de microorganismos en el útero y el funcionamiento del SII favorece la aparición de estos procesos. Deben tratar de evitarse, por lo tanto, daños en el canal del parto mediante una adecuada gestión de los cruzamientos y evitando las manipulaciones innecesarias o inexpertas del feto durante el parto, de esta forma se reducirá considerablemente la contaminación bacteriana del útero (Giuliodori et al., 2013). En este mismo sentido, juega un papel importante las condiciones del lugar en el que se produce el parto, ya que una paridera sucia o la ausencia de la misma, predispone al acúmulo de suciedad en la piel y el pelo de la vaca, favoreciendo a su vez la contaminación del útero (Sheldon *et al.*, 2008; Azwai, 2008).

Así mismo, también deberían ser controladas las alteraciones metabólicas en el postparto (cetosis, hipocalcemia, etc.) mediante una alimentación adecuada en el periodo de transición, de esta forma, se favorecerá un adecuado funcionamiento del SII (Grinberg et al., 2008; Martínez et al., 2012). Además también se disminuirá el balance energético negativo y se reducirá la movilización de ácidos grasos, impidiendo que puedan activar el proceso inflamatorio (Sordillo & Aitken, 2009)

8.2.- Favorecer la rápida y completa resolución de los procesos inflamatorios del útero. En caso de no poder evitarlos, el riesgo de evolucionar a una ES se puede reducir mediante el tratamiento rápido y adecuado del proceso. En este

sentido, la monitorización del postparto, periodo de máximo riesgo, sería de gran ayuda en la prevención (LeBlanc, 2010a).

8.3.- Favorecer una respuesta inflamatoria adecuada. Al ser este apartado más específico del problema que nos ocupa, nos detendremos un poco más para explicar las diferentes estrategias basadas en los epígrafes comentados en el capítulo de etiología.

8.3.1.- Estrés oxidativo: como ya ha sido comentado, los ROS pueden provocar una respuesta inflamatoria exacerbada y prolongada en el tiempo. Para evitar este problema, provocado por el desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes, podría resultar útil la administración de antioxidantes exógenos (Sordillo et al., 2009). De hecho, existen numerosos estudios que indican como la suplementación de vitamina E, A, C,  $\beta$ -caroteno o Se tienen un efecto positivo sobre el proceso inflamatorio (Sordillo et al., 2009) y más concretamente sobre la prevención de la aparición de mamitis y metritis en vacas de leche (Spears & Weiss, 2008; Bouwstra et al., 2009; Sordillo et al., 2009). De todas formas, parece importante aportar estas sustancias en su justa medida, ya que existen evidencias de que la excesiva suplementación con antioxidantes podría incrementar la formación de ROS (Rizzo et al., 2013).

Hay que tener en cuenta que existen muchos antioxidantes que el animal obtiene a través del alimento (Vitamina A, C, E, etc., u oligoelementos como el Se), mientras que otros son sintetizados por el propio organismo. Su suplementación puede realizarse añadiéndolos al alimento o por vía parenteral, siendo la primera la más utilizada (Abuelo et al., 2015).

8.3.2.- Tipo de ácidos grasos presentes en la dieta. Existe la suposición de que dependiendo de los ácidos grasos que se incluyan en la dieta de las vacas podría inclinarse la balanza de la producción de eicosanoides hacia un lado

(pro-inflamatorios) u otro (anti-inflamatorios) según convenga, consiguiendo un efecto sobre el proceso inflamatorio. En humanos, se ha podido comprobar como las dietas ricas en ácidos grasos omega-3 son útiles en el tratamiento y prevención de determinados procesos de origen inflamatorio (enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, etc.) gracias a su efecto modulador de la respuesta inmune, disminuyendo la inflamación y los daños producidos por ésta (Valenzuela et al., 2011). Por su parte, en ganado vacuno, Silvestre et al. (2011a y b), demostraron cómo una dieta rica en ácidos grasos omega-3 administrada entre los 35 y 165 días postparto, favorecería un efecto antiinflamatorio. Además éste podría ser el responsable de la disminución en las tasas de mortalidad embrionaria que observaron en su estudio. Por otra parte, la suplementación con ácidos grasos omega-6 en diferentes momentos del periodo de transición, arroja resultados contradictorios. Mientras que en algunos estudios la incidencia de endometritis en el postparto no se modificó (Colazo et al., 2009; Salehi et al., 2016) en otros se redujo significativamente su incidencia (Dirandeh et al., 2013).

En definitiva, a la vista de los numerosos trabajos y de los variados resultados (probablemente por el uso de diferentes fuentes de ácidos grasos y diferentes periodos de suplementación) se puede decir que, a falta de más estudios sobre el tema, reemplazar parte de los ácidos grasos omega-6 de la dieta por omega-3 podría tener un efecto beneficioso sobre las características productivas y reproductivas de las vacas de leche.

## **9.- BIBLIOGRAFÍA**

Abuelo, A.; Hernández, J.; Benedito, J.L.; Castillo, C. (2015). The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting

antioxidant supplementation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99: 1003–1016.

Ahmadi, M.R.; Dehghan, S.A. (2007). Evaluation of the treatment of Repeat breeder dairy cows with Uterine lavage plus PGF2  $\alpha$  with or without cephalixin. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 31: 125-129.

Azawi, O.I. (2008) Postpartum uterine infection in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 105:187-208.

Bajcsy, A.C.; Szenci, O.; Doornenbal, A.; van der Weijden, G.C.; Csorba, C.; Kocsis, L.; Szücs, I.; Ostgard, S.; Taverne, M.A.M. (2005). Characteristics of bovine early puerperal uterine contractility recorded under farm conditions. *Theriogenology*. 64: 99–111.

Barański, W.; Podhalicz-Dzięgielewska, M.; Zduńczyk, S.; Janowski, T. (2012). The diagnosis and prevalence of subclinical endometritis in cows evaluated by different cytologic thresholds. *Theriogenology* 78: 1939–1947.

Barlund, C.S.; Carruthers, T.D.; Waldner, C.L.; Palmer, C.W. (2008). A Comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 69: 714–723.

Barrio, M.; Becerra, J.J.; Herradón, P.G.; Sebastian, F.; Fernandez, M.; Quintela, L.A. (2014). Fertility in cows with endometritis diagnosed by cytology at day 30 postpartum. Proceedings of the 12th International Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA) Alicante, Spain, 16-18 October 2014

Bartlett, P.C.; Kirk, J.H.; Wilke, M.A.; Kaneene, J.B.; Mather, E.C. (1986). Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian Cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Prev. Vet. Med.* 4: 235-248.

Bell, A.W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J. Anim. Sci.* 73: 2804–2819.

Bell, M.J.; Roberts, D.J. (2007). The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology*. 68(7): 1074-1079.

Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Lacetera, N.; Nardone, A. (2005). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 2017–2026

Bocci, V. (1996). Ozone as bioregulator: Pharmacology and toxicology of ozone therapy today. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*. 10: 31-53.

BonDurant, R.H. (1999) Inflammation in the bovine reproductive tract. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 2): 101-110.

Bonnett, B.N.; Miller, R.B.; Etherington, W.G.; Martin, S.W.; Johnson, W.H. (1991). Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Can. J. Vet. Res.* 55: 155-161.



Bonomini, F.; Tengattini, S.; Fabiano, A.; Bianchi, R.; Rezzani, R. (2008). Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol. Histopath.* 23: 381-390.

Bouwstra, R.J.; Nielen, M.; van Werven, T. (2009). Comparison of the oxidative status of vitamin E-supplemented and non-supplemented cows under field conditions. *Tijdschr. Diergeneeskd.* 134: 656-661.

Brandt, G.W.; Manning, J.P. (1969) Improved uterine biopsy technics for diagnosing infertility in the mare. *Vet. Med. Small. Anim. Clin.* 64: 977-983.

Bretzlaff, K. (1987). Rationale for treatment of endometritis in dairy cows. *Vet. Clin. Food. Anim.* 3: 593-598.

Brick, T.A.; Schuenemann, G.M.; Bas, S.; Daniels, J.B.; Pinto, C.R.; Rings, D.M.; Rajala-Schultz, P.J. (2012). Effect of intrauterine dextrose or antibiotic therapy on reproductive performance of lactating dairy cows diagnosed with clinical endometritis. *J. Dairy Sci.* 95: 1894-1905

Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D.; Schumacher, J.; Love, C.C.; Hinrichs, K.; Hartman, D.L. (2011). Endometritis. In: Brinsko, S.P.; Blanchard, T.L.; Varner, D.D.; Schumacher, J.; Love, C.C.; Hinrichs, K.; Hartman, D.L. (Eds.). *Manual of equine reproduction*. 3<sup>a</sup> edition. Mosby, Saint Louis, pp: 73-84 (Chapter 6)

Brinsko, S.P.; Varner, D.D.; Blanchard, T.L.; Meyers, S.A. (1990). The effect of postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares. *Theriogenology*. 33: 465-475.

Bronicki, M.; Dembinski, Z.; Bronicka, A. (1996). Effect of lipid metabolism disorders on the blood progesterone level in cows in the perinatal period. *Zeszyty Naukowe. Zootechnika. Akademia Rolnicza w Szczecinie.* 33: 7-13.

Burke, C.R.; Meier, S.; McDougall, S.; Compton, C.; Mitchell, M.; Roche J. R. (2010). Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 5363-5373.

Cao, Y.Z.; Reddy, C.C.; Sordillo, L.M. (2000). Altered eicosanoid biosynthesis in selenium-deficient endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 381-389.

Cederlund, H.; Mardh, P.A. (1993). Antimicrobial activities of N-acetylcysteine and some non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 32: 903-904.

Chapwanya, A.; Meade, K.G.; Doherty, M.L.; Callanan, J.J.; Mee, J.F.; O'Farrelly, C. (2009) Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. *Theriogenology.* 71: 1396-1407.

Cheong, S.H.; Nydam, D.V.; Galvão, K.N.; Croiser, B.M.; Gilbert, R.O. (2011). Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94: 762-770.

Cheong, S.H.; Nydam, D.V.; Galvão, K.N.; Crosier, B.M.; Ricci, A.; Caixeta, L.S.; Sper, R.B.; Fraga, M.; Gilbert, R.O. (2012). Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 77: 858-864.

Chirife, J.; Herszage, L.; Joseph, A.; Kohn, E.S. (1983). In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: Microbiological basis for the use of sugar in treating infected wounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23: 766-773.

Colazo, M.G.; Hayirli, A.; Doepel, L.; Ambrose, D.J. (2009). Reproductive performance of dairy cows is influenced by prepartum feed restriction and dietary fatty acid source. *J. Dairy Sci.* 92: 2562-2571.

Coleman, E.S.; Elsasser, T.H.; Kemppainen, R.J.; Coleman, D.A.; Sartin, J.L. (1993). Effect of Endotoxin on Pituitary Hormone Secretion in Sheep. *Neuroendocrinology.* 58:111-122.

Contreras, G.A.; Raphael, W.; Mattmiller, S.A.; Gandy, J.; Sordillo, L.M. (2012). Nonesterified fatty acids modify inflammatory response and eicosanoid biosynthesis in bovine endothelial cells. *J. Dairy Sci.* 95(9): 5011-5023.

Couto, G.B.; Vaillancourt, D.H.; Lefebvre, R.C. (2013). Comparison of a leukocyte esterase test with endometrial cytology for diagnosis of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 79: 103-107.

de Boer, N.W.; LeBlanc, S.J.; Dubuc, J.; Meier, S.; Heuwieser, W.; Arlt, S.; Gilbert, R.O.; McDougall, S. (2014). Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive-tract infection and inflammation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 3983-3999.

Debertolis, L.; Gaetano, M.; Barbara, M.; Sabine, M.; Eleonora, I.; Heinrich, B. (2015). Effects of an induced endometritis on uterine blood flow in cows evaluated by transrectal Doppler sonography. *J. Vet. Sci.* 17(2): 189-197.

Deng, Q.; Odhiambo, J.F.; Farooq, U.; Lam, T.; Dunn, S.M.; Gänzle, M.G.; Ametaj, B.N. (2015). Intravaginally administered lactic acid bacteria expedited uterine involution and modulated hormonal profiles of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98: 6018–6028.

Denis-Robichaud, J.; Dubuc, J. (2015). Randomized clinical trial of intrauterine cephalosporin infusion in dairy cows for the treatment of purulent vaginal discharge and cytological endometritis. *J. Dairy Sci.* 98: 6856-6864.

Dini, P.; Farhoodi, M.; Hostens, M.; Van Eetvelde, M.; Pascottini, O. B.; Fazeli, M. H.; Opsomer, G. (2015). Effect of uterine lavage on neutrophil counts in postpartum dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 158: 25-30

Dirandeh, E.; Towhidi, A.; Ansari Pirsaraei, Z.; Adib Hashemi, F.; Ganjkanlou, M.; Zeinoaldini, S.; Rezaei Roodbari, A.; Saberifar, T.; Petit, H.V. (2013). Plasma concentrations of PGFM and uterine and ovarian responses in early lactation dairy cows fed omega-3 and omega-6 fatty acids. *Theriogenology.* 80: 131-137.

Djuricic, D.; Vince, S.; Ablondi, M.; Dobranic, T.; Samardzija, M. (2012). Effect of Preventive Intrauterine Ozone Application on Reproductive Efficiency in Holstein Cows. *Reprod. Dom. Anim.* 47: 87–91.

Douglas, G.N.; Rehage, J.; Beaulieu, A.D.; Bahaa, A.O.; Drackley, J.K. (2007). Prepartum nutrition alters fatty acid composition in plasma, adipose tissue, and liver lipids of periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 2941-2959.

Drillich, M.; Beetz, O.; Pftzner, A.; Sabin, M.; Sabin, H.J.; Kutzer, P.; Nattermann, H.; Heuwieser, W. (2001). Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84: 2010-2017.

Drillich, M.; Raab, D.; Wittke, M.; Heuwieser, W. (2005). Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes: A field trial. *Theriogenology*. 63: 1811-1823.

Drillich, M.; Tesfayec, D.; Ringsc, F.; Schellanderc, K.; Heuwiesera, W.; Hoelker, M. (2012). Effects of polymorphonuclear neutrophil infiltration into the endometrial environment on embryonic development in superovulated cows. *Theriogenology*. 77: 570-578

Dubuc, J.; Duffield, T.F.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Leblanc, S.J. (2011). Effects of postpartum uterine diseases on milk production and culling in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 1339-1346.

Dubuc, J.; Duffield, T.F.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; LeBlanc, S.J. (2010). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 5225-5234.

Duru, M.; Nacar, A.; Yonden, Z.; Kuvandik, G.; Helvacı, M.R.; Koc, A.; Akaydin, Y.; Oksüz, H.; Sogüt, S. (2008). Protective effects of N-acetylcysteine on cyclosporine-A-induced nephrotoxicity. *Ren. Fail.* 30:453–459.

Elli, M.; Gaffuri, B.; Frigerio, A.; Zanardelli, M.; Covini, D.; Candiani, M.; Vignali, M. (2001). Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction*. 121(1): 151-154.

Elliot, L.; McMahon, K.J.; Gier, H.T.; Marion, G.B. (1968). Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.* 29: 77-81.

Fernandez, F.I.; Barrio, M.; Quintela, L.A.; Becerra, J.J.; Peña, A.I.; Martinez, D.; Herradon, P.G.; Perez, C. (2014). Use of endometrial cytology and metabolic profiles for selection of embryo donor cows. *Span. J. Agric. Res.* 12(3): 664-671.

Field, S.L.; Dasgupta, T.; Cummings, M.; Orsi, N.M. (2013). Cytokines in Ovarian Folliculogenesis, Oocyte Maturation and Luteinisation. *Mol. Reprod. Dev.* 81(4): 284-314.

Földi, J.; Kulcsar, M.; Pecki, A.; Huyghe, B.; Lohuis, J.A.C.M.; Cox, P.; Huuszenicza, G.Y. (2006) Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 265-281.

Fourichon, C.; Seegersand, H.; Malher, X. (2000). Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta analysis. *Theriogenology.* 53: 1729-1759.

Fredriksson, G.; Kindhal, H.; Sandstedt, K.; Edqvist, L.E. (1985). Intrauterine bacterial findings and release of PGF<sub>2</sub>-alpha in the postpartum dairy cow. *J. Vet. Med. Ser. A.* 32: 368-380.

Galvão, A.M.; Ferreira-Dias, G.; Skarzynski, D.J. (2013). Cytokines and Angiogenesis in the Corpus Luteum. Hindawi Publishing Corporation. *Mediat. Inflamm.* 2013, Article ID 420186, 11 pages.

Galvão, K.N.; Frajblat, M.; Brittin, S.B.; Butler, W.R.; Guard, C.L.; Gilbert, R.O. (2009a). Effect of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92 :4906-4913.

Galvão, K.N.; Greco, L.F.; Vilela, J.M.; Sá Filho, M.F.; Santos, J.E.P. (2009b).

Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 1532-1542

Gautam, G.; Nakao, T.; Koike, K.; Long, S.T.; Yusuf, M.; Ranasinghe, R.M.S.B.K.; Hayashi, A. (2010). Spontaneous recovery or persistence of postpartum endometritis and risk factors for its persistence in Holstein cows. *Theriogenology*. 73: 168-179.

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. *Anim. Reprod. Sci.* 116: 175-187.

Gilbert, R.O.; Shin, S.T.; Guard, C.L.; Erb, H.N. (1998). Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 49: 251.

Gilbert, R.O.; Shin, S.T.; Guard, C.L.; Erb, H.N.; Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 64: 1879-1888.

Gitto, E.; Reiter, R.J.; Karbownik, M.; Tan, D.X.; Gitto, P.; Barberi, S.; Barberi, I. (2002). Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biol. Neonate*. 81: 146-157.

Giuliodori, M.J.; Magnasco, R.P.; Becu-Villalobos, D.; Lacau-Mengido, I.M.; Risco, C.A.; de la Sota, R.L. (2013). Metritis in dairy cows: Risk factors and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 96(6): 3621-3631.

Goff, J.P. (2006). Major advances in our understanding of nutritional influences on bovine health. *J. Dairy Sci.* 89: 1292-1301.

Gores-Lindholm, A.R.; LeBlanc, M.M.; Causey, R.; Hitchborn, A.; Fayerer-Hosken, R.A.; Kruger, M.; Vandenplas, M.L.; Flores, P.; Ahlschwede, S. (2013). Relationships between intrauterine infusion of N-acetylcysteine, equine endometrial pathology, neutrophil function, post-breeding therapy, and reproductive performance. *Theriogenology*. 80(3): 218-227.

Green, M.P.; Ledgard, A.M.; Beaumont, S.E.; Berg, M.C.; McNatty, K.P.; Peterson, A.J.; Back, P.J. (2011). Long-term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *J. Anim. Sci.* 89: 3551-3560

Green, M.P.; Ledgard, A.M.; Berg, M.C.; Peterson A.J.; Back P. J. (2009). Prevalence and identification of systemic markers of sub-clinical endometritis in postpartum dairy cows. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 69: 37-42.

Griffin, J.F.T.; Hartigan, P.J.; Nunn, W.R. (1974). Non-specific uterine infection and bovine fertility I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology*. 1: 91-106.

Grinberg, N.; Elazar, S.; Rosenshine, I.; Shpigel, N.Y. (2008).  $\beta$ -Hydroxybutyrate Abrogates Formation of Bovine Neutrophil Extracellular Traps and Bactericidal Activity against Mammary Pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 76 (6): 2802-2807.

Guennadi, O.G.; Katchalina, T.S.; Katchalina, O.V.; El-Hassoun, H. (2008). The new method of treatment of inflammatory diseases of lower female genital organs. *Rev. Esp. Ozon.* 1: 3-12.



Haan, M. (2014). Effect of Intrauterine Dextrose Therapy on Clinical Recovery and Uterine Status in Lactating Dairy Cows with Clinical Endometritis. Tesis de Master. University of Utrecht.

Haimerl, P.; Arlt, S.; Heuwieser, W. (2012). Evidence-based medicine: quality and comparability of clinical trials investigating the efficacy of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  for the treatment of bovine endometritis. *J. Dairy Res.* 79: 287-296.

Hammon, D.S.; Evjen, I.M.; Dhiman, T.R.; Goff, J.P.; Walters, J.L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113: 21-29.

Heidarpour, M.; Mohri, M.; Fallah Rad, A.H.; Shahreza, F.D.; Mohammadi, M. (2012). Acute-phase protein concentration and metabolic status affect the outcome of treatment in cows with clinical and subclinical endometritis. *Vet. Rec.* 171: 1-5.

Herath, S.; Lilly, S.T.; Fischer, D.P.; Williams, E.J.; Dobson, H.; Bryant, C.E.; Sheldon, I.M. (2009). Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  to prostaglandin E<sub>2</sub> in bovine endometrium. *Endocrinology.* 150: 1912-1920.

Herath, S.; Williams, E.J.; Lilly, S.T.; Gilbert, R.O.; Dobson, H.; Bryant, C.E.; Sheldon, I.M. (2007). Ovarian follicular cells have innate immune capabilities that modulate their endocrine function. *Reproduction.* 134: 683-693.

Hill, J.; Gilbert, R. (2008). Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust. Vet. J.* 86: 312-316.

Hurtgen, J.P. (2006). Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. *Theriogenology*. 66: 560-566.

Huszenicza, G.; Fodor, M.; Gags, M.; Kucsar, M.; Dohmen, M.J.W.; Varmos, M.; Porkolas, L.; Kegel, T.; Bartyik, J.; Lohuis, J.A.C.M.; Janos, S. (1999). Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herd. *Reprod. Dom. Anim.* 34: 237-245.

Janowski, T.; Barański, W.; Łukasik, K.; Skarżyński, D.; Rudowska, M.; Zduńczyk, S. (2013). Prevalence of subclinical endometritis in repeat breeding cows and mRNA expression of tumor necrosis factor  $\alpha$  and inducible nitric oxide synthase in the endometrium of repeat breeding cows with and without subclinical endometritis. *Pol. J. Vet. Sci.* 16(4): 693-699

Kasimanickam, R. K.; Kasimanickam, V. R.; Olsen, J. R.; Jeffress, E. J.; Moore, D. A.; Kastelic, J. P. (2013). Associations among serum pro-and anti-inflammatory cytokines, metabolic mediators, body condition, and uterine disease in postpartum dairy cows. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11: 103.

Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2005). The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology*. 63: 818-30.

Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 62: 9-23.

Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2005b). A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J.* 46: 255-259.

Kaufmann, T.; Drillich, M.; Tenhagen, B.A.; Heuwieser, W. (2010). Correlations between periparturient serum concentrations of non-esterified fatty acids, beta-hydroxybutyric acid, bilirubin, and urea and the occurrence of clinical and subclinical postpartum bovine endometritis. *BMC Vet. Res.* 6:47. <http://biomedcentral.com/1746-6148/6/47>.

Kennedy, P.C.; Miller, R.B. (1993). The female genital system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, editors. *Pathology of domestic animals*. 4th ed., San Diego: Academic Press. p. 378-387.

Lacetera, N.; Scalia, D.; Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Pirazzi, D.; Nardone, A. (2005). Lymphocyte Functions in Overconditioned Cows Around Parturition. *J. Dairy Sci.* 88: 2010-2016.

Lavon, Y.; Leitner, G.; Goshen, T.; Braw-Tal, R.; Jacoby, S.; Wolfenson, D. (2008). Exposure to endotoxin during estrus alters the timing of ovulation and hormonal concentrations in cows. *Theriogenology*. 70: 956-967.

Lavon, Y.; Leither, G.; Voet, H., Wolfenson, D. (2010). Naturally occurring mastitis effects on timing of ovulation, steroid and gonadotrophic hormone concentrations, and follicular and luteal growth in cows. *J. Dairy Sci.* 93: 911-921

Lazzari, G.; Duchi, R.; Colleoni, S.; Baldazzi, L.; Benedetti, V.; Galli, A.; Luini, M.; Ferrari, M.; Galli, C. (2011). Le patologie uterine cliniche e subcliniche come causa di infertilità nelle bovine da latte: studio epidemiologico in due allevamenti della regione Lombardia. *Large Anim. Rev.* 17: 43-47.

LeBlanc, S. (2010a) Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *J. Reprod. Dev.* 56: 29-35.

LeBlanc, S. (2010b). Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle. *J. Reprod. Dev. (Suppl. 56):* S1–S7.

LeBlanc, S.; Leslie, K.; Duffield, T.; Bateman, K.; Keefe, G. (2001). The incidence and impact of clinical endometritis in dairy cows. *J. Anim. Sci. (Suppl. 79):* 187.

LeBlanc, S.J. (2014). Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal.* 8 (Suppl. 1): 54-63.

LeBlanc, S.J.; Duffield, T.F.; Leslie, K.E.; Bateman, K.G.; Keefe, G.P.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2002). Defining and Diagnosing Postpartum Clinical Endometritis and its Impact on Reproductive Performance in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2223-2236.

Lefebvre, R.C.; Stock, A.E. (2012). Therapeutic Efficiency of Antibiotics and Prostaglandin F<sub>2α</sub> in Postpartum Dairy Cows with Clinical Endometritis: An Evidence- Based Evaluation. *Vet. Clin. N. Am.-Food Anim. Pract.* 28: 79-96.

Lima, F.S.; Bisinotto, R.S.; Ribeiro, E.S.; Greco, L.F.; Ayres, H.; Favoreto, M.G.; Carvalho, M.R.; Galvão, K.N.; Santos, J.E.P. (2013). Effects of 1 or 2 treatments with prostaglandin F<sub>2α</sub> on subclinical endometritis and fertility in lactating dairy cows inseminated by timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 96 : 6480-6488.

Liu, I.; Troedsson, M. (2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: yesterday and today. *Theriogenology*. 70: 415-420.

Lopdell, T.; Berg, M.C.; Green, M.P.; Back, P.J. (2011). Effect of sub-clinical uterine infection on plasma aminoacid concentrations in early lactation dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 71:291-295.

López-Gatius, F. (2003). Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology*. 60: 89-99.

Lucy, M.C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci.* 84: 1277-1293.

Machado, V.S.; Oikonomou, G.; Ganda, E.K.; Stephens, L.; Milhomem, M. Freitas, G.L.; Zinicola, M.; Pearson, J.; Wieland, M.; Guard, C.; Gilbert, R.O.; Bicalho, R.C. (2015). The effect of intrauterine infusion of dextrose on clinical endometritis cure rate and reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98: 3849-3858.

Madoz, L.V.; Giuliadori, M.J.; Migliorisi, A.L.; Jaureguiberry, M.; de la Sota, R.L. (2014). Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 1-7.

Madoz, L.V.; Giuliadori, M.J.; Plontzke, J.; Drillich, M.; de la Sota, R.L. (2013). The relationship between endometrial cytology during estrus cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96 (7): 4333-4337

Manspeaker, J.E.; Haaland, M.A. (1983). Implementation of uterine biopsy in bovine reproduction: a practitioner's diagnostic tool. *Vet. Med. / Small Anim. Clin.* 5: 1-15.

Mariño, B.; Barrio, L.; Mociños, J.E.; Guillin, J.L.; Barrio, M.; Becerra, J.J. Herradón, P.G.; Prieto, A.; Fernández, G.; Peña, A.I.; Quintela, L.A. (2015). Relación entre la citología y bacteriología del útero en vacas de producción láctea. *Proceedings XX Congreso internacional ANEMBE de medicina bovina. Burgos, Spain, 6-8 Mayo 2015.*

Markusfeld, O. (1987). Periparturient traits in seven high producing dairy herds: Incidence rates, associated with parity, and interrelationship among traits. *J. Dairy Sci.* 70: 158-168.

Marques, T.C.; Leão, K.M.; Rodrigues, M.C.; Silva, N.C.; Pereira da Silva, R. (2015). Reproductive performance of dairy cows affected by endometritis, pododermatitis and mastitis. *Afr. J. Biotechnol.* 14(28): 2265-2269.

Martinez, N.; Risco, C.A.; Lima, F.S.; Bisinotto, R.S.; Greco, L.F.; Ribeiro, E.S.; Maunsell, F.; Galvão, K.; Santos, J.E.P. (2012). Evaluation of peripartal calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J. Dairy Sci.* 95: 7158-7172.

Mattmiller, S.A.; Carlson, B.A.; Sordillo, L.M. (2013). Regulation of inflammation by selenium and selenoproteins: impact on eicosanoid biosynthesis. *J. Nutr. Sci.* 2: e28.

McArt, J. A.; Nydam, D. V.; Oetzel, G. R.; Overton, T. R.; Ospina, P. A. (2013). Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *Vet. J.* 198(3): 560-570.

McDougall, S., Hussein, H.; Aberdein, D.; Buckle, K.; Roche, J.; Burke, C.; Mitchell, M.; Meier, S. (2011). Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology.* 76: 229-240.

Meier, S.; Priest, N.V.; Burke, C.R.; Kay, J.K.; McDougall, S.; Mitchell, M.D.; Walker, C.G.; Heiser, A.; Loor, J.J.; Roche, J.R. (2014). Treatment with a nonsteroidal antiinflammatory drug after calving did not improve milk production, health, or reproduction parameters in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97(5): 2932-2943

Meira, E.B.Jr.; Henriques, L.C.; Sá, L.R.; Gregory L. (2012). Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 95: 6969-6973.

Melcher, Y.; Prunner, I.; Drillich, M. (2014). Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. *Theriogenology.* 82: 57-63.

Melkus, E.; Witte, T.; Walter, I.; Heuwieser, W.; Aurich, C. (2013). Investigations on the Endometrial Response to Intrauterine Administration of N-Acetylcysteine in Oestrous Mares. *Reprod. Domest. Anim.* 48(4): 591-597.

Miller, J.K.; Brzezinska-Slebodzinska, E.; Madsen, F.C. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 76: 2812-2823.

Moschow, R.; Olds, D. (1966) Effect of age and number of calvings on histological characteristics of the bovine uterus. *J. Dairy Sci.* 49 (6): 642-646.

Murillo, A.; Barrio, M.; Becerra, J.J.; Herradón, P.G.; Quintela, L.A. (2014). Uterus ultrasound evaluation to determine ovulation time in cows. Proceedings of the 12th International Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA). Alicante, Spain, 16-18 October 2014.

Neuvians, T.P.; Schams, D.; Berisha, B.; Pfaffl, M.W. (2004). Involvement of Pro-Inflammatory Cytokines, Mediators of Inflammation, and Basic Fibroblast Growth Factor in Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ -Induced Luteolysis in Bovine Corpus Luteum. *Biol. Reprod.* 70: 473-480.

Nielsen, J.M. (2005). Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology.* 64: 510-518.

Noakes, D.E.; Wallace, L.M.; Smith, G.R. (1990) Pyometra in a Friesian heifer: bacteriological and endometrial changes. *Vet. Rec.*126 (20): 509.

O'Boyle, N.; Corl, C.M.; Gandy, J.C.; Sordillo, L.M. (2006). Relationship of body condition score and oxidant stress to tumor necrosis factor expression in dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113: 297-304.

Ohtani, S.; Okuda, K.; Nishimura, K.; Mohri, S. (1993). Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology.* 39: 1033-1042.

Paksoy, Z.; Das, H. (2013). Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs to Improve Fertility in Cows, Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed, Dr. Alemayehu Lemma (Ed.) Available from: <http://www.intechopen.com/books/success-in-artificial-insemination-quality-of-semen-and-diagnostics-employed/nonsteroid-anti-inflammatory-drugs-to-improve-fertility-in-cows> [21 Jul. 2016].



Peeler, E.J.; Otte, M.J.; Esslemont, R.J. (1994). Recurrence odds ratios for periparturient diseases and reproductive traits of dairy cows. *Br. vet. J.* 150: 481-488.

Pérez-Giraldo, C.; Rodríguez-Benito, A.; Moran, F.J.; Hurtado, C.; Blanco, M.T.; Gómez-García, A.C. (1997). Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 643-646.

Perez-Marin, C. C.; Calero, G. V.; Moreno, L. M. (2012). Clinical approach to the repeat breeder cow syndrome. INTECH Open Access Publisher.

Plöntzke, J.; Madoz, L.V.; de la Sota, R.L.; Drillich, M.; Heuwieser, W. (2010). Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Anim. Reprod. Sci.* 122: 52-57.

Polat, B.; Cengiz, M.; Çolak, A.; Cannazik, O. (2015). Comparison of Intrauterine Ozone and Rifaximine Treatment in Cows with Subclinical Endometritis. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 21 (5): 773-776.

Pothmann, H.; Prunner, I.; Wagener, K.; Jaureguiberry, M.; de la Sota, R.L.; Erber, R.; Aurich, C.; Ehling-Schulz, M.; Drillich, M. (2015). The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology.* 83: 1249-1253

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: 127-134.

Priest, N. (2013). The effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug on subclinical endometritis in dairy cows and the identification of at-risk cows. Tesis Doctoral. Lincoln University. New Zealand.

Priest, N.V.; McDougall, S.; Burke, C.R.; Roche, J.R.; Mitchell, M.; McLeod, K.L.; Greenwood, S.L.; Meier, S. (2013). The responsiveness of subclinical endometritis to a nonsteroidal antiinflammatory drug in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96: 4323-4332

Prieto, M.; Barrio, M.; Quintela, L.A. Perez-Marin, C.C.; Becerra, J.J.; Vigo, M.; Diaz, C.; Cainzos, J.; Prieto, A.; Fernandez, F.I.; Martinez, D.; Herradon, P.G. (2012). Validation of a simple method for the interpretation of uterine cytology in cows. *Vet. Med.* 57(7): 360-363.

Quintela, L.A.; Díaz, C.; Herradón, P.G.; Peña, A.I.; Becerra, J.J. (2006). *Ecografía y Reproducción en la vaca*. Servicio de publicaciones Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.

Quintela, L. A.; Barrio, M.; Pena, A.I.; Becerra, J.J.; Cainzos, J.; Herradon, P.G.; Diaz, C. (2012). Use of ultrasound in the reproductive management of dairy cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 47: 34-44.

Quintela, L.A. (2011). La fertilità bovina ed i fattori che la influenzano. Congresso Internazionale SIVAR. Cremona, 6-7 mayo de 2011.

Quintela, L.A.; Becerra, J.J.; Cainzos, J.; Prieto, A.; Díaz, C.; Mourazos, N.; Fernández, F.I.; Martínez, D.; Barrio, M.; Herradón, P.G. (2010). La citología endometrial en la vaca. *Boletín de anembe*. Marzo-Abril de 2010: 26-32.

Reddy, N.C.S.; Bramhaiah, K.V.; Naidu, K.S.; Kumar, R.V.S. (2012). Effect of uterine lavage on bacterial count and conception rate in repeat breeder crossbred cows. *Indian J. Anim. Reprod.* 33: 59-61.

Ricci, A.; Gallo, S.; Molinaro, F.; Dondo, A.; Zoppi, S.; Vicenti, L. (2015). Evaluation of subclinical endometritis and consequences on fertility in Piedmontese beef cows. *Reprod. Dom. Anim.* 50: 142-148.

Rivest, S.; Lee, S.; Attardi, B.; Rivier, C. (1993). The chronic intracerebroventricular infusion of interleukin-1 beta alters the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of cycling rats. I. Effect on LHRH and gonadotropin biosynthesis and secretion. *Endocrinology.* 133(6): 2424-2430

Rizzo, A.; Pantaleo, M.; Mutinati, M.; Minoia, G.; Trisolini, C.; Ceci, E.; Sciorsci, R. L. (2013). Blood and milk oxidative status after administration of different antioxidants during early postpartum in dairy cows. *Res. Vet. Sci.* 95: 1171-1174.

Roger, H.; Aurich, C. (2010). Treatment of Persistent Mating-Induced Endometritis in Mares with the Non-Steroid Anti-Inflammatory Drug Vedaprofen. *Reprod. Dom. Anim.* 45: 458-460.

Royal, M.; Mann, G.E.; Flint A.P. (2000). Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet. J.* 160(1): 53-60.

Runciman, D.J.; Anderson, G.A.; Malmo, J. (2009). Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalosporin on reproductive performance. *Aust. Vet. J.* 87: 369-378.

Sakumoto, R.; Okuda, K. (2004). Possible actions of tumor necrosis factor-  $\alpha$  in

ovarian function. *J. Reprod. Dev.* 50 (1): 39-46.

Sakumoto, R.; Shibaya, M.; Okuda, K. (2003). Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) inhibits progesterone and estradiol 17- $\beta$  production from cultured granulosa cells: Presence of TNF- $\alpha$  receptors in bovine granulosa and theca cells. *J. Reprod. Dev.* 49 (6): 441-449.

Salasel, B.; Mokhtari, A.; Taktaz, T. (2010). Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*. 74: 1271-1278.

Salehi, R.; Colazo, M.G.; Gobikrushanth, M.; Basu, U.; Ambrose, D.J. (2016). Effects of prepartum oilseed supplements on subclinical endometritis, pro- and anti-inflammatory cytokine transcripts in endometrial cells and postpartum ovarian function in dairy cows. *Reprod. Fertil. Dev.* <http://dx.doi.org/10.1071/RD15334>.

Santos, N.R.; Roman, H.B.; Gilbert, R.O. (2006). The use of leukocyte esterase reagent strips for diagnosis of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*. 66: 666-667.

Scalia, D.; Lacetera, N.; Bernabucci, U.; Demeyere, K.; Duchateau, L.; Burvenich, C. (2006). In Vitro Effects of Nonesterified Fatty Acids on Bovine Neutrophils Oxidative Burst and Viability. *J. Dairy Sci.* 89:147-154

Schrick, F.N.; Hockett, M.E.; Towns, T.M.; Saxton, A.M.; Wert, N.E.; Wehrman, M.E. (2001). Administration of a Prostaglandin Inhibitor Immediately Prior to Embryo Transfer Improves Pregnancy Rates in Cattle. *Theriogenology*. 55: 370 (Abstr).

Sheldon, I.M.; Cronin, J.; Goetze, L.; Donofrio, G.; Schuberth H.J. (2009). Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. *Biol. Reprod.* 81: 1025-1032.

Sheldon, I.M.; Lewis, G.; LeBlanc, S.; Gilbert, R. (2006). Defining postpartum uterine disease in dairy cattle. *Theriogenology.* 65: 1516-1530.

Sheldon, I.M.; Noakes, D.E. (1998) Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet. Rec.* 142: 575-579.

Sheldon, I.M.; Noakes, D.E.; Rycroft, A.N.; Pfeiffer, D.U.; Dobson H. (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction.* 123: 837-845.

Sheldon, I.M.; Rycroft, A.N.; Dogan, B.; Craven, M.; Bromfield, J.J.; Chandler, A.; Roberts, M.H.; Price, S.B.; Gilbert, R.O.; Simpson, K.W. (2010). Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *Plos One.* 5: e9192.

Sheldon, I.M.; Williams, E.J.; Miller, A.N.A.; Nash, D.M.; Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet. J.* 176: 115-121.

Sheldon, IM. (2004). The postpartum uterus. *Vet. Clin. Food Anim.* 20: 569-591.

Shimizu, T.;Miyachi, K.; Shirasuna, K.; Bollwein, H.; Magata, F.; Murayama, C.; Miyamoto, A. (2012). Effects of lipopolysaccharide (LPS) and peptidoglycan

(PGN) on estradiol production in bovine granulosa cells from small and large follicles. *Toxicol. Vitro.* 26: 1134-1142

Shrestha, H.K.; Nakao, T.; Suzuki, T.; Akita, M.; Higaki, T. (2005). Relationships between body condition score, body weight, and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre-service period in high-producing dairy cows in a subtropical region in Japan. *Theriogenology.* 64: 855-866.

Silva, R.A.; Garotti, J.E.G.; Silva, R.S.; Navarini, A.; Pacheco, A.Jr. (2009). Analysis of the bactericidal effect of ozone pneumoperitoneum. *Acta Cir. Bras.* 24: 124-127.

Silvestre, F.T.; Carvalho, T.S.; Crawford, P.C.; Santos, J.E.; Staples, C.R.; Jenkins, T.; Thatcher, W.W. (2011a). Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute-phase proteins. *J. Dairy Sci.* 94: 2285-2301.

Silvestre, F.T.; Carvalho, T.S.M.; Francisco, N.; Santos, J.E.P.; Staples, C.R.; Jenkins, T.C.; Thatcher, W.W. (2011b). Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation. *J. Dairy Sci.* 94: 189-204.

Singh, J.; Murray, R.D.; Mshelia, G.; Woldehiwet, Z. (2008). The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Vet. J.* 175: 301-309.

Singh, J.; Sidhu, S.S.; Dhaliwal, G.S.; Pangaonkar, G.R.; Nanda, A.S.; Grewal, A.S.

(2000). Effectiveness of lipopolysaccharide as an intrauterine immunomodulator in curing bacterial endometritis in repeat breeding cross-bred cows. *Anim. Reprod. Sci.* 59: 159-166

Sordillo, L.M. (2014). Inmunidad de la glándula mamaria y susceptibilidad de mamitis. *Proceedings XIX Congreso Internacional de Medicina Bovina*. Oviedo, Spain. 25 a 27 de junio: 104-113.

Sordillo, L.M.; Aitken, S.L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128: 104-109.

Sordillo, L.M.; O'Boyle, N.; Gandy, J.C.; Corl, C.M.; Hamilton, E. (2007). Shifts in thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 90: 1186-1192.

Sordillo, L.M.; Streicher, K.L.; Mullarky, I.K.; Gandy, J.C.; Trigona, W.; Corl, C.M. (2008). Selenium inhibits 15-hydroperoxyoctadecadienoic acid-induced intracellular adhesion molecule expression in aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 44: 34-43.

Sordillo, L.M.; Weaver, J.A.; Cao, Y.Z.; Corl, C.; Sylte, M.J.; Mullarky, I.K. (2005). Enhanced 15-HPETE production during oxidant stress induces apoptosis of endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid. Mediat.* 76: 19-34.

Soto, P.; Natzke, R.P.; Hansen, P.J. (2003). Identification of Possible Mediators of Embryonic Mortality Caused by Mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, Prostaglandin F<sub>2a</sub>, and the Nitric Oxide Generator, Sodium Nitroprusside Dihydrate, on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle. *Am. J. Reprod. Immunol.* 50: 263-272.

Spears, J.W.; Weiss, W.P. (2008): Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.* 176: 70-76.

Ster, C.; Loisel, M.C.; Lacasse, P. (2012). Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J. Dairy Sci.* 95 :708-717

Strowitzki, T.; Germeyer, A.; Popovici, R.; von Wolff, M. (2006). The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum. Reprod. Update.* 12: 617-630.

Tras, B.; Dinc, D. A.; Uney, K. (2014). The effect of N-acetylcysteine on the treatment of clinical endometritis and pregnancy rate in dairy cows. *Eurasian J. Vet. Sci.* 30(3): 133-137.

Valenzuela, R.B.; Tapia, G.O.; González, M.E.; Valenzuela, A.B. (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Rev. Chil. Nutr.* 38(3): 356-367.

van Knegsel, T.M.; de Vries Reilingh, G.; Meulenberg, S.; van den Brand, H.; Dijkstra, J.; Kemp, B.; Parmentier, H.K. (2007). Natural Antibodies Related to Energy Balance in Early Lactation Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90: 5490-5498.

Walsh, S.W.; Williams, E.J.; Evans, A.C.O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123: 127-138.

Weaver, J.A.; Maddox, J.F.; Cao, Y.Z.; Mullarky, I.K.; Sordillo, L.M. (2001). Increased 15-HPETE production decreases prostacyclin synthase activity during oxidant stress in aortic endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 30: 299-308.



Wehrend, A.; Failing, K.; Bostedt, H. (2003). Cervimetry and Ultrasonographic Observations of the Cervix Regression in Dairy Cows During the First 10 days Post Partum. *J. Vet. Med. A* 50: 470-473.

Williams, E.J.; Fischer, D.P.; Noakes, D.E.; England, G.C.; Rycroft, A.; Dobson, H.G.; Sheldon, I.M. (2007). The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*. 68: 549-559.

Witte, T.S.; Melkus, E.; Walter, I.; Senge, B.; Schwab, S.; Aurich, C.; Heuwieser, W. (2012). Effects of oral treatment with N-acetylcysteine on the viscosity of intrauterine mucus and endometrial function in estrous mares. *Theriogenology*. 78(6): 1199-1208.

Zaayer, D.; van der Horst, C.J. (1986). Non-fertility in cows: treatment with PGF and investigation of uterine biopsies. *Cytobios*. 45: 55-70.

Zimran, A.; Wasser, G.; Forman, L.; Gelbart, T.; Beutler, E. (2000). Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. *Acta Haematol*. 102: 148-152.

Zobel, R.; Tkalcic, S. (2012). Efficacy of Ozone and Other Treatment Modalities for Retained Placenta in Dairy Cows. *Reprod. Dom. Anim*. 48: 121-125.







## **OBJETIVOS**



El objetivo general de este trabajo ha sido ampliar el conocimiento en algunos aspectos relativos a las endometritis subclínicas que actualmente aun son objeto de controversia: su impacto en las explotaciones de vacuno lechero y su diagnóstico. Para lo cual, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

- Determinar la prevalencia de ES en el postparto de vacuno lechero.
- Determinar el impacto de las ES sobre la fertilidad en la primera inseminación postparto.
- Implementar un método sencillo para la evaluación de las citologías endometriales.
- Evaluar la concordancia entre diferentes métodos de diagnóstico de ES.
- Evaluar la concordancia entre los resultados obtenidos en ambos cuernos uterinos utilizando diferentes métodos de diagnóstico de ES.
- Determinar la presencia y tipo de microorganismos aislados de úteros con ES



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN/CAPÍTULOS**

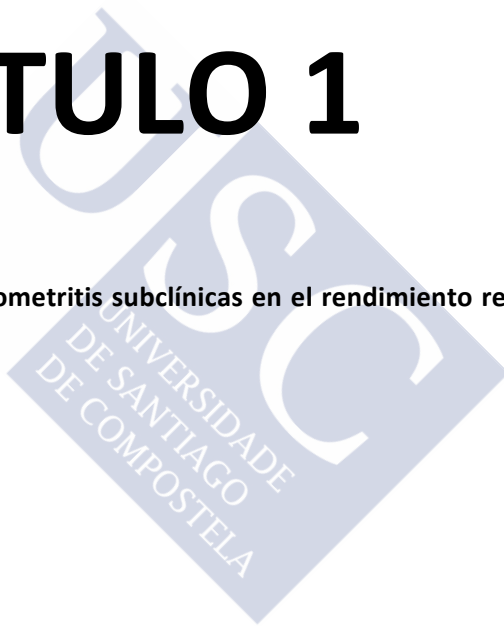






# CAPITULO 1

**Influencia de las endometritis subclínicas en el rendimiento reproductivo de vacas lecheras**



## **Resumen**

El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de las endometritis subclínicas (ES) en el rendimiento reproductivo de vacas de aptitud láctea. Para ello se examinaron 94 vacas de aptitud láctea de entre 1 y 8 partos, distribuidas en 25 rebaños. Los animales fueron explorados una vez entre los 30 y 45 días en leche empleando la palpación rectal, el vaginoscopio y la ecografía. Se tomó una muestra citológica del endometrio sólo en aquellas vacas con una aparente salud uterina (n=65).

Además, se tomó una muestra sanguínea donde se analizaron los valores de glucosa, colesterol total, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados,  $\beta$ -hidroxibutirato, proteínas totales, albúmina, urea y de las enzimas hepáticas (ASAT y ALAT). A lo largo de los siguientes 11 meses se registraron los índices reproductivos de los animales. Se consideró a la citología endometrial como indicadora de ES cuando el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos era superior al 5% de todas las células presentes en el frotis (excepto los eritrocitos).

Los resultados indicaron que el 14,9% de las vacas muestreadas con la citología uterina tenían ES, y que las vacas sanas quedaban preñadas significativamente antes que las que presentaban ES (hazard ratio=2,35; intervalo de confianza 95%: 1,05-5,3). De todas las variables metabólicas y productivas analizadas, sólo los triglicéridos afectaron negativamente a la reproducción; mientras que, la concentración de albumina sérica, la puntuación de la condición corporal y la producción láctea tuvieron un efecto positivo en el rendimiento reproductivo.

En conclusión, nuestros resultados indican que las ES tienen un impacto negativo en el rendimiento reproductivo y es necesario emplear la citología uterina para diagnosticarla ya que casi un 15% de los animales afectados no fueron detectados por ninguno de los otros métodos de diagnóstico.

**Palabras clave:** endometritis subclínica, vaca de leche, ecografía, citología endometrial.

### Introducción

El período de postparto es considerado como el más importante en la vida reproductiva de la vaca debido a su influencia sobre su futura fertilidad (Oltenu et al., 1983). Se considera normal la contaminación uterina que tiene lugar en el parto, o en los días posteriores, donde el 80-100% de los animales tienen bacterias en el interior de la luz del útero en las primeras dos semanas de postparto (Sheldon et al., 2006). El desarrollo de una enfermedad clínica se debe a que se produce un desequilibrio entre la inmunidad del hospedador y la patogenicidad de las bacterias (Grohn & Rajala-Schultz, 2000).

Es importante señalar que el mecanismo primario de defensa del útero bovino es la fagocitosis de los organismos contaminantes por parte de los neutrófilos. Por lo tanto, la presencia de neutrófilos en el interior de la luz uterina es un excelente indicador de la existencia de un proceso inflamatorio activo (Wade & Lewis, 1996). Esto es especialmente importante en las ES, ya que en éstas el examen físico del tracto reproductivo puede no revelar evidencias de la inflamación (Mateus et al., 2002). Las ES se caracterizan por la inflamación del endometrio que se traduce en un deterioro del rendimiento reproductivo sin apreciar signos de endometritis clínica (Sheldon et al., 2006).

Entre las herramientas diagnósticas más comúnmente utilizadas, la palpación rectal es probablemente la que más frecuentemente se emplea, a nivel de granja, en el diagnóstico de las infecciones uterinas, pero también podría ser el método que presenta una menor sensibilidad y especificidad (Gilbert & Schwark, 1992). Por su parte, el examen mediante un vaginoscopio es un procedimiento sencillo que permite la evaluación de las características de los fluidos existentes en la parte anterior de la vagina y en el orificio cervical externo (Bretzlaff, 1987). Por su parte, la ecografía transrectal (US) también ha sido empleada para detectar el acúmulo de líquido intrauterino (Kasimanickam et al., 2004; 2005) o el diámetro cervical (LeBlanc et al., 2002) y, a pesar de que ofrece la ventaja de poder realizar un diagnóstico inmediato, su utilidad en las ES parece ser limitado.

Finalmente, el examen citológico mediante cytobrush se ha demostrado como el procedimiento más preciso para el diagnóstico de las endometritis (Barlund et al., 2008), que podría ayudar a solucionar el impacto negativo que esta afección pudiese tener sobre el rendimiento reproductivo en vacas lecheras. Sin embargo, la citología no se emplea frecuentemente en la práctica diaria debido a que sus resultados no son inmediatos y que se necesita de más tiempo que con otros métodos para realizar el diagnóstico.

Por otra parte, debe recordarse que la producción de leche en la vaca aumenta a un ritmo más rápido que la ingesta de energía durante las primeras 4 a 6 semanas tras el parto, por lo que aquellas vacas de elevada producción experimentarán algún grado de balance energético negativo (BEN) y un balance negativo de otros nutrientes durante las primeras etapas del postparto. El BEN ha sido relacionado con el aumento de las concentraciones séricas de triglicéridos (TAG) y de  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB), y el descenso de las

de glucosa y colesterol en las vacas en el periparto (Lean et al., 1992). Pero además, elevados niveles hepáticos de TAG se han asociado con un mayor intervalo parto a la primera ovulación y con una menor fertilidad (Butler & Smith, 1989). En la actualidad es un hecho constatado que tanto las concentraciones de progesterona (Vila-Godoy et al., 1988), como el comportamiento estral (Spicer et al., 1990) y los días hasta la primera ovulación se ven afectados por el grado del BEN en el comienzo de la lactación.

Por lo tanto, el objetivo del presente experimento ha sido determinar la prevalencia de las ES, diagnosticadas mediante el empleo de la citología uterina, en un grupo de vacas que previamente habían sido diagnosticadas como sanas empleando la exploración rectal, vaginoscopia o ultrasonidos, y su posible impacto sobre la fertilidad postparto. En el análisis se han tenido en cuenta potenciales factores de confusión en el análisis del rendimiento reproductivo como son los desórdenes metabólicos o el nivel de producción.

### **Material y métodos**

Para este estudio, se emplearon vacas de raza Holstein (de 1-8 partos) procedentes de 25 granjas localizadas en el noroeste de España. El tamaño medio de las explotaciones fue de 35 animales, oscilando desde los 15 a los 90. La producción media anual de leche (a 305 días) fue de 8.610Kg. En 15 de las granjas los animales se encontraban en estabulación trabada, mientras que en las otras 10 se manejaban en estabulación libre con cubículos. En todas ellas se empleaba un carro mezclador para la preparación de las raciones. Los rebaños estaban controlados mediante programas de reproducción con una periodicidad de exploración mensual o bimensual.

Todos los animales que parieron entre octubre de 2008 y febrero de 2009 fueron evaluados para conocer su estado reproductivo entre 30-45 días en leche (DIM) y, si los animales se encontraban en fase luteínica del ciclo estral o en anestro, eran incluidos en el estudio y se tomaba una muestra de sangre. Las vacas que se encontraban en celo no se emplearon en el estudio. Finalmente se seleccionaron 94 vacas que fueron examinadas por exploración rectal, vaginoscopia y US. Las vacas que presentaban cualquier signo de endometritis (descargas anormales de fluido uterino, fluido anormal en el interior del útero o un aumento de tamaño anormal del útero) diagnosticado por cualquiera de los tres métodos, fueron consideradas como que presentaban endometritis clínica y por lo tanto excluidas del estudio (n=29).

Las vacas sin signos detectables de endometritis fueron muestreadas con una citología endometrial (n=65). Señalar que las vacas que se encontraban en su primer mes de postparto no fueron empleadas ya que la involución uterina podría no haber finalizado aún (Gautam et al., 2009) y, por lo tanto, el hallazgo de un elevado porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en la citología uterina podría ser normal.

La citología uterina fue obtenida empleando un cytobrush (Quicklock 2000, Minitube Iberica, Barcelona, España) enroscado al émbolo de un catéter de inseminación artificial (modificado de Kasimanickam et al., 2004). El cytobrush se rotaba sobre un portaobjetos limpio, dejándose secar al aire. Las muestras fueron teñidas con Diff Quick (Quick Panoptic®, Tarragona, España). Todas las preparaciones fueron examinadas por la misma persona empleando un microscopio óptico (CHT, Olympus, Barcelona) a 400 aumentos. Se contaron un mínimo de 150 células (excluyendo a los eritrocitos) en cada preparación para obtener una evaluación cuantitativa de la inflamación endometrial. Las

muestras con  $\geq 5\%$  de neutrófilos se incluyeron en la categoría de ES positiva (Gilbert et al., 2005). Los resultados no fueron comunicados a los ganaderos para prevenir las acciones individuales en las vacas positivas y sólo los investigadores dispusieron de esa información.

Tras el examen genital, se tomó una muestra sanguínea mediante la punción de la vena cocígea. Las muestras de suero fueron centrifugadas y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis. Los análisis fueron realizados mediante un fotómetro digital (Selecta MD200, Barcelona) a excepción de las proteínas totales que se analizaron empleando un refractómetro portátil (SELECTA, Barcelona). Las concentraciones de glucosa, colesterol total, TAG y de albúmina fueron determinados por un método colorimétrico de punto final empleando reactivos Biosystems® (Biosystems, Barcelona); las enzimas hepáticas (Alanin Transaminasa [ALAT], Aspartato Aminotransferasa [ALAT]) fueron analizadas mediante el método IFCC (Federación Internacional de Química Clínica) (Tietz, 1991) empleando los reactivos Biosystems®; la urea fue analizada con un método colorimétrico enzimático empleando los reactivos Spinreact® (Spinreact, Sant Esteve de Bas, España) y los ácidos grasos no esterificados (NEFA) y el BHB fueron analizados con kits enzimático cinéticos (Randox Laboratorios, Antrim, UK).

Al mismo tiempo se registraron los datos específicos de cada animal (puntuación de la condición corporal [BCS], número de parto, fecha de parto) y las alteraciones periparto (asistencia al parto, retención de membranas fetales, abortos, hipocalcemia, cetosis, mamitis, etc.). Comenzando en el momento del examen reproductivo, se recogieron los datos de inseminaciones, diagnósticos de gestación y la producción lechera a partir del software de manejo



reproductivo del rebaño, durante los 11 meses siguientes a la toma de muestras.

Se empleó un análisis de Kaplan-Meier para comparar los intervalos entre el parto y la concepción y entre el parto y la primera inseminación y el número de servicios por concepción (S/C), en animales con ES o sin ella. Además, se empleó el análisis de supervivencia para examinar el número de S/C considerando cada servicio como un “período de tiempo” (Gilbert et al., 2005).

El número de partos, la producción a 305 días, la condición corporal, el perfil bioquímico (glucosa, NEFA, BHB, colesterol total, TAG, proteínas totales, albúmina, urea, ASAT, ALAT) y los resultados de las citologías se incluyeron en un modelo de regresión de Cox para los intervalos parto concepción, parto primera inseminación y para S/C. En todas las variables independientes se confirmó que cumpliesen la asunción de riesgo proporcional. Los modelos fueron construidos empleando una eliminación escalonada inversa empleando el test estadístico likelihood-ratio, con umbral de valores de  $p < 0,1$  para su inclusión y de  $> 0,15$  para su exclusión

## **Resultados**

Las medias estimadas en el análisis de Kaplan-Meier para los intervalos parto concepción, parto primera inseminación y S/C se muestran en la tabla 3. Las vacas con citologías endometriales negativas quedaban preñadas antes (HR=2,35; 95% CI: 1,05-5,29) que las que presentaban ES (Figura 1).

Sólo los TAG y la albúmina tuvieron efectos significativos en el intervalo entre el parto y la concepción de acuerdo con el modelo de Cox. Los altos niveles de albúmina o bajas concentraciones de TAG estaban asociadas con un intervalo entre el parto y la concepción más corto (tabla 4). Además, el aumento de la

producción de leche estuvo asociado con un intervalo entre el parto y la concepción más corto. Ninguna otra variable metabólica tuvo relación con el intervalo entre el parto y la concepción.

	n	Parto concepción	Parto primera inseminación	Inseminaciones por gestación
<b>ES</b>	14	154 (82.50-225.50)	77 (64.17-89.83)	3 (1.90-4.11)
<b>No Endom.</b>	51	119 (88.14-149.86)	68 (61.91-74.10)	2 (1.10-2.90)
<b>p</b>	65	0.09	0.11	0.19

Tabla 3. Resultados del análisis de Kaplan-Meier para los intervalos entre el parto y la concepción y primera inseminación y las inseminaciones/gestación (mediana (intervalo de confianza)).

El intervalo entre el parto y la primera inseminación y el número de S/C no presentaron diferencias significativas entre los animales sanos y los que presentaban ES. Sólo los niveles de TAG mostraron un efecto significativo sobre el número de S/C y el BCS tuvo un efecto sobre el intervalo entre el parto y la primera inseminación (tabla 4).

Variabes dependientes	Variabes en ecuación	p	HR	95% IC HR
Intervalo parto-concepción	Producción*100 (305d)	0.05	0.98	0.96-1.00
	TAG (mg/dL)	0.01	0.92	0.87-0.98
	Albumina (g/L)	0.05	1.05	1.00-1.10
	PMN < 5%	0.04	2.35	1.05-5.29
Intervalo parto-1ª IA	CC	0.008	2.62	1.29-5.34
Servicios/Concepción	TAG (mg/dL)	0.02	0.94	0.88-0.99

Tabla 4.- Factores que afectan a las características reproductivas obtenidos mediante el análisis de regresión de (CC = Condición corporal; IC = Intervalo de confianza; HR = Índice de riesgo; PMN = Polimorfonucleares neutrofilos; TAG =Triglicéridos).

En este estudio, la prevalencia de ES (14,9%) encontrada entre los 30 y 45 DIM fue más bajo que el mencionado por otros autores [34%, Kasimanickam et al. (2004); 53%, Gilbert et al. (2005)] y más alto que los descritos por Lopdell et al. en 2011 (7%). Estas discrepancias pudieran ser debidas a los diferentes períodos de postparto elegidos para realizar el diagnóstico, a los diferentes puntos de corte empleados para los PMN, o a los diferentes sistemas de manejo de las granjas estudiadas. Una de las razones de la baja prevalencia de ES encontrada en este estudio fue el criterio empleado en el diagnóstico, así una vaca era considerada con ES cuando el proceso era diagnosticado exclusivamente por citología endometrial. Además, cualquier cantidad de fluido ecogénico visto en el interior del útero era considerado como un signo positivo de padecer endometritis clínica (Barlund et al., 2008). Por lo tanto, es posible que se hayan clasificado como endometritis clínicas algunos casos que otros investigadores podrían haberlas considerado como subclínicas (Kasimanickam et al., 2004).

Por otro lado, el punto de corte de los PMN empleado para establecer el límite entre animales sanos y otros con ES fue significativamente más bajo que el propuesto por otros autores (Kasimanickam et al., 2004; Sheldon et al., 2008), por lo tanto, es poco probable que este factor haya sido el responsable de la menor prevalencia encontrada en nuestro experimento. Las diferencias tampoco parecen poder ser atribuibles a la técnica citológica empleada, ya que el cytobrush es más sensible que el lavado uterino para la detección de las ES (Kasimanickam et al., 2005).

Distintos estudios realizados en vacuno lechero muestran un aumento en los días abiertos y un descenso en la probabilidad de quedar preñadas antes de los 300d postparto en vacas con endometritis diagnosticadas por citología

después de los 40 o 50d postparto (Gilbert et al., 2005). De igual manera, los resultados de nuestro experimento muestran un efecto de las ES en el intervalo desde el parto a la concepción: 80% de las vacas sanas quedaron preñadas dentro de los 200d de postparto, mientras que sólo el 60% de las vacas con ES lo hicieron (figura 5).

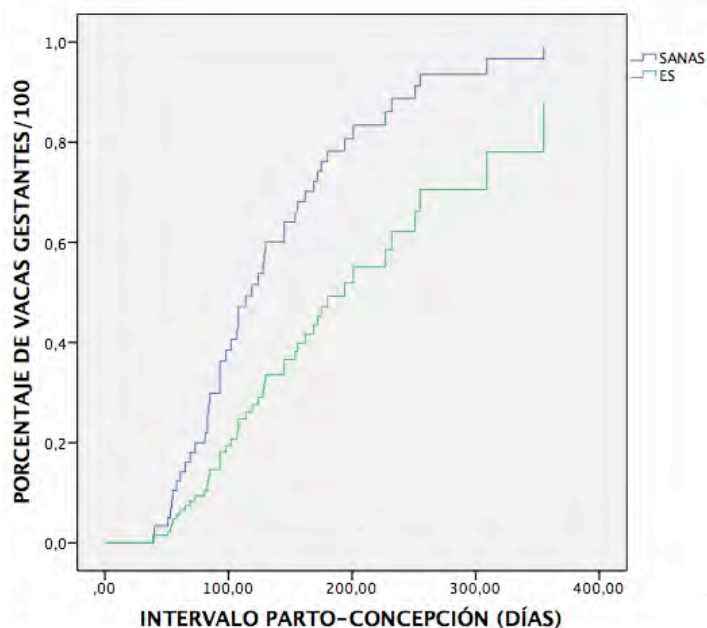


Figura 5. Intervalo parto concepción basado en la presencia o ausencia de endometritis subclínica.

Debe mencionarse que el papel de los PMN en el proceso inflamatorio es la rápida inactivación y eliminación de estructuras autólogas externas y alteradas. Además, ejercen varias funciones reguladoras como la liberación de citocinas, el cebado, la activación o inhibición de células, o influir en la expresión de las moléculas de superficie (Baggioline et al., 1993). Ciertas citocinas podrían disminuir la liberación de la hormona luteinizante (McCann

et al., 2000) lo que provocaría un retraso en el comienzo de la actividad ovárica cíclica postparto y aumentaría el intervalo desde el parto a la primera inseminación. En el presente estudio, el intervalo parto a la primera inseminación no fue significativamente diferente en los dos grupos de animales considerados (68d para las vacas sanas frente a 77d para las vacas con ES). Aunque las dos variables (mayor intervalo parto primera inseminación y mayor número de S/C) individualmente no mostraron efectos significativos, ambas juntas contribuyeron al aumento significativo del intervalo parto gestación que fue encontrado en las vacas con ES.

No se puede olvidar que los problemas reproductivos pueden estar asociados con desequilibrios en el estado metabólico de los animales. Por lo tanto, con el propósito de aislar el efecto de las ES, se incluyeron varias variables metabólicas en el modelo de Cox para evaluar su posible influencia en la reproducción. La necesidad de analizar parámetros metabólicos se debió a que varias granjas no tenían buenos registros en cuanto a la aparición de enfermedades metabólicas, o no siempre eran diagnosticadas (como por ejemplo las cetosis subclínicas). Sólo TAG, albúmina, BCS y la producción lechera tuvieron algún efecto significativo sobre la reproducción.

Encontramos que los TAG afectaban negativamente al intervalo parto concepción, y el BCS afectaba negativamente al intervalo parto primera inseminación. Debe tenerse en cuenta que los TAG se acumulan en el hígado tras la movilización de la grasa corporal y son considerados un buen indicador del BEN (Rukkwamsuk et al., 1999). Otros autores han relacionado altos niveles de TAG en el hígado (Butler & Smith, 1989) y el BEN (Beam & Butler, 1999) con un mayor intervalo entre el parto y la primera ovulación, y con baja fertilidad. Los niveles de BHB (Kessel et al., 2008), NEFA (Bronicki et al., 1996) y

urea (Moreira da Silva et al., 1997) han sido asociados con parámetros reproductivos adversos, pero tales efectos no han sido vistos en este estudio. Sin embargo, el pequeño número de vacas diagnosticadas con ES en este estudio puede haber enmascarado la influencia de estas variables en la reproducción. Por otro lado, los parámetros metabólicos fueron analizados durante el segundo mes de postparto, y quizás este no sea el mejor momento para determinar su efecto sobre la reproducción, ya que como se sabe el BEN es más severo durante los primeros 30d (Cavestany et al., 2005). Por el contrario, la albúmina tuvo un efecto positivo sobre la eficiencia reproductiva, posiblemente ligada al correcto funcionamiento hepático, ya que la albúmina es un buen indicador de la salud de este órgano (Lubojacká et al., 2005).

No se puede extraer una conclusión definitiva de este estudio ya que el número de vacas diagnosticadas con metritis subclínica entre los días 30 y 45 de postparto fue bajo (14) y por lo tanto, el impacto real del estatus metabólico de las vacas en la reproducción podría no ser determinado de forma fiable. Sin embargo, se observó un efecto negativo de las ES en el rendimiento reproductivo. La citología endometrial podría ser empleada como un método rápido y fácil para el diagnóstico de endometritis subclínicas y debería ser recomendado a los veterinarios prácticos ya que una parte importante de los animales que padecen endometritis subclínicas no pueden ser diagnosticados por exploración rectal, ni empleando un vaginoscopio ni por ecografía.

## **Bibliografía**

Baggiolini, M.; Boulay, F.; Badwey, J.A.; Curnutte, J.T. (1993). Activation of neutrophil leukocytes: chemoattractant receptors and respiratory burst. *Faseb J.* 7: 1004-1010.

Barlund, C.S.; Carruthers, T.D.; Waldner, C.L.; Palmer, C.W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology.* 69: 714-723.

Beam, S.W.; Butler, W.R. (1999). Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fert. (Suppl. 54):* 411-424.

Bretzlaff, K. (1987). Rationale for treatment of endometritis in dairy cows. *Vet. Clin. Food Anim.* 3: 593-598.

Bronicki, M.; Dembinski, Z.; Bronicka, A. (1996). Effect of lipid metabolism disorders on the blood progesterone level in cows in the perinatal period. *Zeszyty-Naukowe-Akademii-Rolniczej-w-Szczecinie-Zootechnika.* 33: 7-13.

Butler, W.R.; Smith, R.D. (1989). Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72: 767-783.

Cavestany, D.; Blanc, J.E.; Kulcsar, M.; Uriarte, G.; Chilibroste, P.; Meikle, A.; Febel, H.; Ferraris, A.; Krall, E. (2005). Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system: metabolic profiles. *J. Vet. Med.* 52: 1-7.

Ducker, M.J.; Haggett, R.A.; Fisher, W.J.; Morant, S.V.; Bloomfield, G.A. (1985). Nutrition and reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Prod.* 41: 1-12.

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. *Anim. Reprod. Sci.* 116: 175-187.

Gilbert, R.; Shin, S.T.; Guard, C.L. (2005). Prevalence of endometritis and its effect on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 64: 1879-1888.

Gilbert, R.O.; Schwark, D.S. (1992). Management of peripartum condition in the cow. *Vet. Clin. Food Anim.* 8: 40-55.

Grohn, Y.T.; Rajala-Schultz, P.J. (2000). Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 605-614.

Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 62: 9-23.

Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2005). A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J.* 46: 255-259.

Kessel, S.; Stroehl, M.; Meyer, H.H.D.; Hiss, S.; Sauerwein, H.; Schwarz, F.J.; Bruckmaier, R.M. (2008). Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions. *J. Anim. Sci.* 86(11): 2903-2912.



Lean, I.J.; Farver, T.B.; Troutt, H.F.; Bruss, M.L.; Galland, J.C.; Baldwin, R.L.; Holmberg, C.A.; Weaver, L.D. (1992). Time series cross-correlation analysis of postparturient relationships among serum metabolites and yield variables in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 75: 1891-1900.

LeBlanc, S.J.; Duffield, T.F.; Leslie, K.E.; Bateman, K.G.; Keefe, G.P.; Walton, J.S. (2002). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2223-2236.

Lopdell, T.; Berg, M.C.; Green, M.P.; Back, P.J. (2011). Effect of sub-clinical uterine infection on plasma aminoacid concentrations in early lactation dairy cows. *Proc. New Zealand Society of Animal Production.* 71: 291-295.

Lubojacká, V.; Pechova, A.; Dvoak, R.; Drastich, P.; Kummer, V.; Poul, J. (2005). Liver steatosis following supplementation with fat in Dairy cow diets. *Acta Vet. Brno.* 74: 217-224.

Mateus, L.; Lopes da Costa, L.; Bernardo, F.; Silva, J.R. (2002). Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod. Dom. Anim.* 37: 31-35.

McCann, S.M.; Kimura, M.; Karanth, S.; Yu, W.H.; Mastronardi, C.A.; Rettori, V. (2000). The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. *Ann. NY Acad. Sci.* 917: 4-18.

Moreira da Silva, F.; Burvenich, C.; Massart-Leen, A.M.; Russel-Pinto, F.F. (1997). Effect of some reproduction hormones on the oxidative burst of bovine neutrophils. *Flemish Vet. J.* 66: 297-314.

Oltenacu, P.A.; Britt, J.H.; Braun, R.K.; Melleberger, R.W. (1983). Relationships among type of parturition, type of discharge from genital tract, involution of cervix, and subsequent reproductive performance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 66: 612-619.

Rukkwamsuk, T.; Kruij, T.A.; Meijer, G.A.; Wensing, T. (1999). Hepatic fatty acid composition in periparturient dairy cows with fatty liver induced by intake of a high energy diet in the dry period. *J. Dairy Sci.* 82(2): 280-287.

Sheldon, I.M.; Lewis, G.S.; LeBlanc, S.; Gilbert, R.O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. 65: 1516-1530.

Sheldon, I.M.; Williams, E.J.; Miller, A.N.A.; Nash, D.M.; Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet. J.* 176: 115-121.

Spicer, L.J.; Tucker, W.B.; Adams, G.D. (1990). Insulin-like growth factor-1 in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrus behavior. *J. Dairy Sci.* 73: 929-937.

Tietz, N.W. (1991). *Clinical guide to laboratory test*. 2<sup>nd</sup> ed. WB Saunders Co.

Villa-Godoy, A.; Hughes, T.L.; Emery, R.S.; Chapin, L.T.; Fogwell, R.L. (1988). Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71: 1063-1072.

Wade, D.E.; Lewis, G.S. (1996). Exogenous prostaglandins F<sub>2</sub>α stimulate utero-ovarian release of PGF<sub>2</sub>α in sheep: A possible component of the leukocyte mechanism of action of PGF<sub>2</sub>α. *Dom. Anim. Endocrinol.* 13: 383-395.



# CAPITULO 2

Validación de un método sencillo para la interpretación de las citologías uterinas en la vaca



## Resumen

Uno de los principales inconvenientes del empleo de la citología endometrial en la vaca es el tiempo requerido para la toma de una muestra y su posterior interpretación. Se recomienda contar un gran número de células y calcular el porcentaje de Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN). Sin embargo, ya que contar un gran número de células es un método laborioso sería preferible, para simplificar el análisis, contar el número de PMN en un reducido número de campos de microscopio. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar si una prueba sencilla, basada en el cálculo del número medio de PMN en 10 campos de observación a 1000x, podría ser una técnica fiable para el diagnóstico de las endometritis.

Para ello, se tomaron doscientas sesenta muestras endometriales en vacas de raza Holstein en diferentes etapas del postparto empleando un cytobrush adaptado para su uso en esta especie. Los frotis así obtenidos fueron fijados al aire y teñidos con la técnica de Romanowsky. Para evaluar el método se calculó el porcentaje de PMN existente en 150 células, así como el número medio de PMN existente en 10 campos a 1000x. Se construyeron curvas ROC (del inglés Receiver operating characteristic) para evaluar el nuevo método, utilizando el porcentaje de PMN como referencia y el número medio de PMN como método a evaluar. Se observó que el área bajo la curva es (independientemente del punto de corte utilizado) superior a 0,99 y la correspondencia entre ambos métodos era de 1,58 PMN/campo para el valor de punto de corte de 15% y de 2,40 PMN/campo para el valor de punto de corte de 20%.

Estos resultados demuestran que este método sencillo podría ser empleado para determinar el porcentaje de PMN en las citologías endometriales y para el diagnóstico de las endometritis en la vaca.

**Palabras clave:** Endometritis subclínica, vaca de leche, polimorfo nucleares neutrófilos, curvas ROC

## Introducción

La endometritis subclínica se define como una inflamación del endometrio en ausencia de enfermedad sistémica o síntomas locales, y se ha asociado con un retraso de la involución uterina (Kasimanickam et al., 2004). Se han descrito varias causas que pueden ocasionar un incremento en la susceptibilidad del útero a padecer traumatismos e infecciones lo que podría provocar desde ligeras endometritis hasta metritis tóxicas (Kasimanickam et al., 2005). Por lo tanto, existen numerosos factores de riesgo implicados en la aparición de las enfermedades uterinas en vacas lecheras entre los que se pueden incluir la retención de placenta, las distocias, los partos múltiples, el número de parto, el manejo, así como factores medioambientales y genéticos (Coleman et al., 1985). Tales situaciones tienen un efecto negativo en la eficiencia reproductiva debido a que incrementan el número de servicios por concepción, el intervalo entre el parto y la primera inseminación artificial y el intervalo entre el parto y la preñez, reduciendo de este modo la tasa de concepción (Fourichon et al., 2000; Heuwieser et al., 2000; Leblanc et al., 2002).

A lo largo de las últimas décadas se han descrito varios procedimientos para el diagnóstico de las endometritis subclínicas, pero sólo algunos pueden ser aplicados para la recogida de células endometriales en la especie bovina. En

estas técnicas, las células endometriales e inflamatorias pueden ser recogidas empleando una torunda de algodón protegida (Studer & Morrow, 1978), mediante una biopsia uterina (Bourke et al., 1997), un lavado uterino (Hammon et al., 2001) o con un cytobrush (Glenthoj et al., 1986). Es importante resaltar que las técnicas citológicas basadas en el lavado uterino o en el empleo del cytobrush resultan menos invasivas que la biopsia uterina (Kasimanickam et al., 2005).

Por su parte, parece demostrado que el cytobrush es un procedimiento menos perjudicial para el endometrio que el lavado uterino. Esto se debe a que los fluidos empleados pueden provocar una irritación endometrial (Brook, 1993). Además, cuando se emplea el lavado la solución salina que se introduce en el útero provoca que aumente el tiempo necesario para obtener la muestra. También se han descrito hasta un 17% de fallos en el intento de recuperar el fluido introducido y además esta técnica podría alterar la morfología de las células recogidas (Kasimanickam et al., 2005).

En la actualidad, las endometritis son uno de los temas más controvertidos entre los veterinarios clínicos del ganado vacuno debido, sobre todo, a la falta una técnica diagnóstica de referencia (Kasimanickam et al., 2005). No se puede olvidar que se han aislado múltiples especies bacterianas en más del 90% de las vacas en las primeras etapas del postparto, sin embargo la prevalencia de las endometritis disminuye con el tiempo (Elliot et al., 1968).

Otro de los aspectos a tener en cuenta son los mecanismos defensivos del útero. Así, los neutrófilos constituyen la primera barrera defensiva contra los organismos patógenos invasores en el postparto, esto provoca que se produzca un aumento de la población de PMN dentro de la luz uterina (Butter et al., 1993). En la última década se han realizado distintas propuestas sobre

cuál sería el porcentaje de neutrófilos que indicaría que la vaca padecería una ES. Hammond et al. (2006) consideraron como vacas con ES todas aquellas que tuviesen un recuento de PMN superior al 25% en el día  $28 \pm 3$  de postparto, mientras que otros investigadores establecían porcentajes mayores del 18% o del 10% en muestras endometriales recogidas entre los días 21 a 33 o del 34 al 47 de postparto, respectivamente (Kasimanickam et al., 2004; Sheldon et al., 2006). Por otra parte, se ha postulado que más de un 5% de PMN podría ser un punto de corte adecuado para valorar la inflamación en vacas cuando el análisis se realizase mediante lavado uterino entre los días 40 a 60 de postparto (Drillich et al., 2005; Gilbert et al., 2005). Finalmente, no se puede olvidar que también se han observado diferencias cuando las muestras eran evaluadas por distintos técnicos (Santos et al., 2009) por lo que sería recomendable controlar las variaciones entre distintos técnicos.

Por lo tanto y aunque la citología endometrial en las vacas no es una técnica complicada, parece posible desarrollar un método más sencillo que el utilizado habitualmente. Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar la correlación existente entre dos métodos diferentes para calcular el número de células inflamatorias (PMN) presentes en la citología endometrial, y se propuso la hipótesis de que el número medio de PMN en 10 campos podría ser un método eficiente para estimar el porcentaje total de PMN.

### **Material y Métodos**

Para este estudio se obtuvieron muestras endometriales de 260 vacas adultas, aparentemente sanas. Todos los animales fueron sometidos a un exhaustivo examen que incluía la exploración rectal, vaginoscopia y ecografía para descartar a todos los animales que presentasen síntomas de endometritis



clínica. Las muestras fueron tomadas de vacas en ordeño entre los días 35 a 45 del postparto.

Las citologías endometriales fueron tomadas con un cytobrush adaptado sobre una barra de acero, cubierto por una camisa sanitaria de plástico, que fue introducido a través del cérvix hasta el cuerpo uterino. En ese momento, el cepillo se rotaba sobre la pared uterina y posteriormente era retirado. Las muestras fueron preparadas rodando el cepillo sobre un portaobjetos de vidrio limpio y rotulado y posteriormente se dejó secar al aire. Los frotis fueron teñidos con una tinción Romanowski (Panoptico®, Panreac, Barcelona, España) antes de su examen al microscopio.

La evaluación fue realizada siguiendo dos procedimientos diferentes:

- (A) Observación e identificación de un total de 150 células a 1000x y cálculo del porcentaje de PMNs. Este método fue considerado como la prueba de referencia.
- (B) Determinación de los PMNs presentes en 10 campos a 1000x y cálculo del número medio de PMN por campo. Este fue considerado el procedimiento para su validación.

#### Análisis estadístico

Inicialmente se realizó una correlación de Pearson y a continuación se utilizaron curvas ROC (receiver operating characteristics) para determinar las equivalencias de diferentes puntos de corte (no se ha utilizado un punto de corte concreto debido a que varía en función del tiempo transcurrido desde el parto). Las curvas ROC constituyen una herramienta fundamental y unificadora en el proceso de evaluación y uso de las pruebas diagnósticas cuyo resultado pueda plantearse en términos de dicotomía (presencia o ausencia de

enfermedad). Este análisis estadístico ha permitido calcular para los diferentes puntos de corte, la equivalencia en el método probado y la especificidad y sensibilidad del punto de corte en la prueba b. Además, el cálculo del área bajo la curva (ABC) ROC es una medida global de la exactitud de la prueba diagnóstica. Se define como la probabilidad de clasificar correctamente un par de individuos sano y enfermo, seleccionados al azar de la población, mediante los resultados obtenidos al aplicarles la prueba diagnóstica. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico SPSS 15.0.

### **Resultados y Discusión**

La correlación entre el método de referencia (porcentaje de PMNs) y el procedimiento propuesto fue significativa ( $r=0,843$ ;  $P<0,01$ ).

Como se muestra en la tabla 5, la sensibilidad siempre fue la mayor posible y la especificidad también fue elevada (más del 0,95). Los resultados obtenidos demuestran que todas las muestras positivas podrían ser diagnosticadas y sólo una muy baja proporción de muestras negativas quedarían sin detectar. El método de referencia (A) necesitó de un mayor período de tiempo para la evaluación del frotis, debido al elevado número de células a contar. Sin embargo, cuando se empleó el procedimiento propuesto (B) fue necesario mucho menos tiempo para contar las células. A pesar del tiempo necesario para hacer el diagnóstico, el punto crítico es el establecimiento de un procedimiento que pueda ser realizado en las granjas. El procedimiento B demostró que es una técnica rápida, fácil y exacta para el diagnóstico de las endometritis subclínicas.

Procedimiento A	ABC	Procedimiento B	Sensibilidad	Especificidad
30%	0.995	7.70	100%	98.4%
25%	0.993	2.40	100%	96.8%
20%	0.994	2.40	100%	97.2%
15%	0.997	1.58	100%	98.0%
10%	0.996	1.13	100%	97.5%
5%	0.992	0.52	100%	95.3%

Tabla 5.- Puntos de corte correspondientes a los dos métodos de recuento de PMN obtenidos mediante el análisis de Curvas ROC (del inglés Receiver Operating Characteristic). ABC (área bajo la curva).

Otro intento de simplificar la evaluación de la citología endometrial consistió en la evaluación subjetiva de las ES, empleada por Santos et al. (2009) en vacuno de aptitud cárnica. En este trabajo se validaba la evaluación subjetiva, empleando el 5,5% de PMN como punto de corte, obteniendo una correlación de 0,83, una especificidad del 100%, una sensibilidad del 78% y un área bajo la curva de 0,951. Los valores mencionados fueron más bajos que los obtenidos en el presente estudio. El tiempo requerido para la evaluación subjetiva empleada por Santos et al. (2009) y para el recuento de PMN en 10 campos fue muy similar. El hecho de haber obtenido mejores resultados y de haber necesitado un tiempo similar para su realización, confirman la idoneidad del método propuesto en este trabajo para el diagnóstico de citologías endometriales en la vaca. Además, la evaluación subjetiva debería ser valorada con cada observador y el resultado podría ser sesgado.

En resumen, se puede concluir que el diagnóstico de la endometritis (clínica o subclínica) puede ser llevado a cabo determinando la media de PMN en 10 campos, obteniendo la misma eficiencia que mediante el cálculo del

porcentaje de PMN en 150 células. Es de destacar que el método aquí propuesto es más rápido y más fácil de llevar a cabo.

### **Bibliografía**

Bourke, M.; Mills, J.N.; Barnes, A.L. (1997). Collection of endometrial cells in the mare. *Aust. Vet. J.* 75: 755-758.

Brook, D. (1993). Uterine cytology. In: McKinnon AO, Voss JL, (eds.). *Equine reproduction*. 2<sup>nd</sup> ed: London. Lea and Febiger: 246-254.

Butt, B.M.; Senger, P.L.; Widders, P.R. (1993). Neutrophil migration in the bovine uterine lumen following intrauterine inoculation with killed *Haemophilus somnus*. *J. Reprod. Fert.* 93: 341-345.

Coleman, D.A.; Thayne, W.V.; Diley, R.A. (1985). Factors affecting reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 68: 1793-1803.

Drillich, M.; Lincke, A.; Kersting, S.; Arlt, S.; Heuwieser, W. (2005). Treatment of subclinical endometritis in dairy cows with enzymes or PGF2 $\alpha$ . *ESDAR 9<sup>th</sup> Annual Conference*, Murcia, Spain, 1 a 3 septiembre. pp 185.

Elliot, L.; McMohan, K.J.; Gier, H.T.; Mrion, G.B. (1968). Uterus of the cow after parturition with bacterial content. *American J. Vet. Res.* 29: 77-81.

Fourichon, C.; Seegers, H.; Malher, X. (2000). Effect of disease on reproduction in dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*. 53: 1729-1759.

Gilbert, R.O.; Shin, S.T.; Guard, C.L.; Erb, H.N.; Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 64: 1879-1888.

Glenthoj, A.; Bostofte, E.; Rank, F. (1986). Brush cytology from the uterine endocervix. *Acta Obstet. Gynecol. Scand*. 65: 689-691.

Hammon, D.S.; Holyoak, G.R.; Jenson, J.; Bingham, H.R. (2001). Effects of endometritis at beginning of the breeding period on reproductive performance in dairy cows. *Proc 34<sup>th</sup> Annu Conf Am Assoc Bov Pract, Vancouver*. pp. 142-143.

Hammon, D.S.; Evjen, I.M.; Dhiman, T.R.; Goff, J.P.; Walters, J.L. (2006). Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 113: 21-29.

Heuwieser, W.; Tenhagen, B.A.; Tischer, M.; Luhr, J.; Blum, H. (2000). Effect of the three programs for the treatment of endometritis on the reproductive performance of a dairy herd. *Vet. Rec*. 146: 338-341.

Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 62: 9-23.

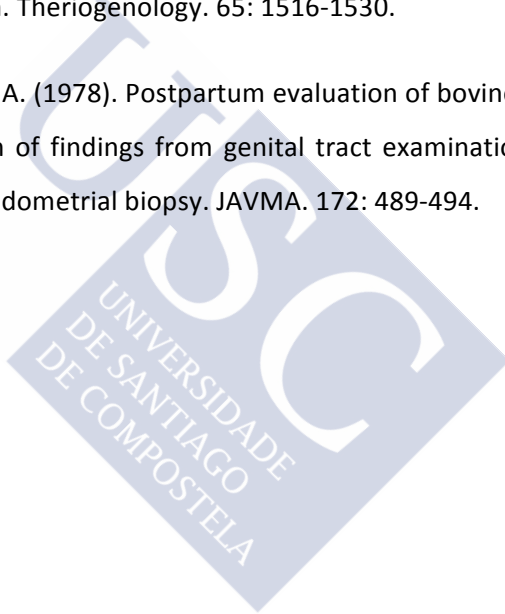
Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2005). A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can. Vet. J*. 46: 255-259.

Leblanc, S.J.; Duffield, T.F.; Leslie, K.E.; Bateman, K.G.; Keefe, G.P.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2002). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2223-2236.

Santos, N.R.; Lamb, G.C.; Brown, D.R.; Gilbert, R.O. (2009). Postpartum endometrial cytology in beef cows. *Theriogenology.* 71: 739-745.

Sheldon, I.M.; Lewis, G.S.; LeBlanc, S.; Gilbert, R.O. (2006). Uterine diseases in cattle after parturition. *Theriogenology.* 65: 1516-1530.

Studer, E.; Morrow, D.A. (1978). Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: Comparison of findings from genital tract examination per rectum uterine culture and endometrial biopsy. *JAVMA.* 172: 489-494.





# CAPITULO 3

**Concordancia entre la citología endometrial, la biopsia y la bacteriología, realizadas postmortem, en vacas lecheras eliminadas.**



## Resumen

El objetivo de este estudio fue determinar: a) la concordancia entre la citología endometrial, la biopsia uterina y la presencia de fluido intrauterino postmortem, en el tracto genital aparentemente sanos de vacas lecheras eliminadas; b) la concordancia entre los resultados obtenidos en ambos cuernos uterinos empleando diferentes métodos de diagnóstico; y c) los microorganismos aislados del útero de vacas con endometritis citológica. Para ello, en un matadero local se recogieron cien tractos genitales, macroscópicamente normales, de vacas Holstein. Las muestras para el análisis citológico, histopatológico y bacteriológico fueron obtenidas de ambos cuernos uterinos y la presencia de cualquier contenido intrauterino fue determinado tras la apertura de los cuernos. El punto de corte empleado para las citologías positivas fue  $\geq 5\%$  PMN. Los datos fueron analizados mediante curvas ROC, el método de la kappa de Cohen y el test  $\chi^2$ .

La presencia de infiltrado inflamatorio y su distribución endometrial fue el único parámetro histológico que tuvo una correlación significativa con los resultados de la citología (ABC: 0,780 y 0,694, respectivamente). La concordancia entre la histología y la citología fue moderada para la presencia de infiltrado (kappa=0,55) y baja si se consideraba la distribución del infiltrado (kappa=0,33). Otros parámetros histológicos (estado del epitelio endometrial, glándulas endometriales o fibrosis), el contenido uterino o la bacteriología no estuvieron correlacionados con la citología.

La presencia de contenido intrauterino estuvo correlacionado significativamente ( $p=0,036$ ) con los resultados de la biopsia. Se apreció una concordancia moderada entre los dos cuernos uterinos para la citología (kappa=0,65) y la biopsia (kappa=0,74). La bacteriología no estuvo relacionada

ni con la citología ni con la biopsia, pero se aislaron diferentes bacterias de aquellos úteros que presentaban citologías negativas o positivas. Se concluyó que la citología endometrial, aunque menos sensible que la biopsia, es una herramienta útil en el diagnóstico de las inflamaciones endometriales subclínicas.

Palabras clave: vaca lechera, endometritis subclínica, citología endometrial, biopsia uterina, bacteriología.

### **Introducción**

La eficiencia reproductiva del ganado vacuno lechero es de suma importancia para la producción de leche ya que afecta significativamente a la rentabilidad de las explotaciones. Por ello, uno de los objetivos principales del manejo reproductivo en las granjas lecheras es conseguir que las vacas alcancen la preñez en un intervalo de tiempo óptimo tras el parto (Plazier et al., 1997; Walsh et al., 2013). Sin embargo, a lo largo de las últimas décadas se ha detectado en muchos países un progresivo y preocupante descenso de la fertilidad de las vacas lecheras, estimándose un descenso en torno al 0,5-1% por año (Royal et al., 2000; López-Gatius, 2003). El descenso en la fertilidad en estos animales puede estar ocasionado por numerosos factores, tales como los antecedentes genéticos, la alimentación inadecuada, el manejo reproductivo deficiente, la ausencia de bienestar o la existencia de enfermedades reproductivas, y no completamente asociadas a un aumento en la producción láctea (Lucy, 2001).

Dentro de esas enfermedades reproductivas, no se puede olvidar que las patologías uterinas postparto son las principales causas del escaso

rendimiento reproductivo y de las pérdidas económicas (Sheldon et al., 2006), ya que provocan infertilidad, aumento de las tasas de eliminación, reducción en la producción láctea y un notable aumento de los costes de tratamiento (Bartlett et al., 1986; Guard, 1994). En este sentido, varios estudios han mostrado que las ES son una enfermedad común en el postparto de vacas lecheras y que están altamente asociadas con pobres rendimientos reproductivos (Kasimanickam et al., 2004; Barrio et al., 2005; Gilbert et al., 2005).

Estas ES se definen como aquellas inflamaciones del endometrio en ausencia de signos clínicos de endometritis (Sheldon et al., 2006) y se caracterizan por la existencia de un infiltrado de PMN sin exudado intrauterino (o con muy pequeña cantidad) (Földi et al., 2006).

Tradicionalmente la citología uterina es la herramienta que más se ha utilizado en el diagnóstico de las ES (Kasimanickam et al., 2005) y, dentro de ésta, el método que emplea el cytobrush se considera el mejor para recoger las muestras endometriales ya que es sencillo, rápido, seguro y efectivo (Barlund et al., 2008; Oral et al., 2009). Por su parte, para evaluar estas citologías endometriales se realiza un recuento del número de PMN en 100 células nucleadas (Melcher et al., 2014), o también se puede determinar el número medio de PMN observados en 10 campos de microscopio (Prieto et al., 2012). Sin embargo, el problema principal continúa siendo que existen serias discrepancias en cuanto a cuál debería ser el punto de corte de los PMN para considerar el diagnóstico de la ES, dependiendo de los días en leche (Melcher et al., 2014).

También existen otros métodos que son empleados en el diagnóstico de las endometritis clínicas en la vaca y que podrían ser válidos para el diagnóstico de las ES, como son:

a) la ecografía, mediante el examen de la presencia de fluido en la luz uterina, evaluando el diámetro del cérvix y de los cuernos (Kasimanickan et al., 2004; Meira et al., 2012), así como la ecotextura de la pared uterina (Küçükaslan et al., 2014)

b) la biopsia uterina, mediante la evaluación del endometrio (Meira et al., 2012; Madoz et al., 2014)

c) la bacteriología, a través del aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en el útero (Lazzari et al., 2011; Madoz et al., 2014).

Aunque la citología endometrial se considera, desde un punto de vista práctico, la mejor herramienta diagnóstica para la ES, su eficacia para detectar lesiones inflamatorias aún no se ha establecido. Además, la concordancia de esta técnica con otros métodos diagnósticos ha sido muy poco estudiada y sus resultados han sido, por ahora, poco prometedores (Kasimanickan et al., 2004; Meira et al., 2012; Madoz et al., 2014).

Por otro lado, también debería prestarse atención a que las muestras uterinas recogidas para realizar una citología o una biopsia en animales vivos normalmente son tomadas de un único cuerno, por lo que es importante conocer si esta muestra sería suficientemente representativa del estado de todo el endometrio.

Finalmente señalar que tampoco existen demasiadas experiencias sobre relación existente entre la presencia de una inflamación endometrial y la existencia de una infección vírica o bacteriana.

Por lo tanto, los objetivos de este estudio han sido determinar: a) la concordancia existente entre citología endometrial, biopsia uterina y la presencia y tipo de contenido uterino en úteros macroscópicamente normales; b) la concordancia entre los resultados obtenidos de los dos cuernos uterinos empleando los diferentes métodos de diagnóstico; y c) la presencia y tipo de microorganismos aislados del útero con o sin endometritis citológica.

## **Material y métodos**

### Recolección postmortem de tractos reproductivos

Entre febrero y mayo del año 2014, se recogieron 395 aparatos genitales de vacas lecheras en un matadero de la provincia de Lugo (Novafrigsa, Lugo, España). Para tratar de evitar la posible contaminación accidental del endometrio, antes de la separación del útero de las vísceras abdominales y pélvicas, se cerró la parte final de la porción craneal de cada cuerno uterino, así como el cérvix, mediante un lazo de nylon.

El tracto genital extraído fue examinado visualmente y por palpación. Se descartaron del estudio todos los aparatos genitales de animales gestantes, además de los que presentaban lesiones macroscópicas en los ovarios, oviductos, en el útero y/o en la vagina y todos aquellos que presentaban fluido intrauterino palpable o descargas vaginales. También fueron excluidos los tractos reproductivos con signos de involución uterina posparto incompleta (cuernos asimétricos, estrías en la pared uterina, carúnculas palpables, etc). Tras el examen inicial, se seleccionaron para el estudio 100 aparatos genitales

aparentemente normales y fueron transportados al laboratorio de Reproducción y Obstetricia de la Facultad de Veterinaria de Lugo.

Los datos del rendimiento reproductivo de las vacas o el motivo de la eliminación eran desconocidos, pero se consideraron irrelevantes para este estudio, ya que el objetivo era evaluar la concordancia entre métodos de diagnóstico independientemente de las potenciales causas o consecuencias de la ES.

#### Recogida de las muestras

Previo a la toma de muestras, se registraron todas las estructuras presentes en los ovarios (cuerpos lúteos y folículos) de cada aparato genital. Las muestras para el examen microbiológico se tomaron del tercio más craneal del cuerno uterino, mientras que las recogidas para el examen histológico procedían del tercio medio de cada cuerno. Finalmente la citología endometrial se llevó a cabo con tejidos procedentes del tercio más caudal de cada cuerno. En resumen, se emplearon tres diferentes regiones para evitar los potenciales artefactos inducidos por la propia toma de muestras.

#### Muestras microbiológicas

Previo a la toma de muestras y para prevenir la contaminación externa del endometrio, se esterilizó la superficie externa de la pared uterina con una espátula calentada con una llama en la parte craneal de cada cuerno uterino. En el área esterilizada, se realizó una incisión en la pared uterina empleando un escalpelo quirúrgico, se introdujo un hisopo estéril y se rodó contra la superficie endometrial. Los hisopos fueron colocados en tubos de plástico sin medio de transporte (Eurotubo, Deltalab SL, Barcelona, España) e

inmediatamente conducidos al laboratorio de enfermedades infecciosas de la Facultad de Veterinaria de Lugo.

Las muestras fueron cultivadas mediante métodos rutinarios de test bacteriológicos para determinar la presencia de bacterias aeróbicas y anaeróbicas (Carter & Cole, 1990; Koneman, 2006). Las bacterias fueron identificadas basándose en las características de las colonias, la tinción Gram, la capacidad hemolítica y el perfil bioquímico.

Para la identificación de virus, los hisopos fueron introducidos en 1mL de PBS. El ADN/ARN fue extraído de la mezcla empleando un kit de extracción comercial siguiendo las instrucciones del fabricante: Nucleospin ARN (Macherey-Nagel, Alemania) y Nucleospin Tejido (Macherey-Nagel, Alemania). Los extractos de ADN fueron evaluados por PCR en tiempo real para detectar BoHV-4, BoHV-1 empleando los correspondientes kits de PCR comerciales: TaqVet Bovine Herpesvirus 4 (Life technologies, USA), Taq Vet IBR (Life technologies, USA): de la misma manera, los ARN extraídos fueron empleados para el test de presencia de ARN de BVDV empleando el Taq Vet BVDV Screening (Life technologies, USA).

#### Muestras para la evaluación histológica (imágenes 3 a 13)

De la parte central de cada cuerno uterino, se tomó una rodaja con unas tijeras y de ella una porción de pared uterina de aproximadamente 2x2 mm. fue fijada en una solución tamponada de formaldehído al 10% y conducida al laboratorio de Histopatología de la Facultad de Veterinaria. Las muestras histológicas fueron procesadas mediante métodos rutinarios (Lee & Luna, 1968). A la mayor brevedad posible, los tejidos fijados en formalina fueron deshidratados mediante inmersión en soluciones crecientes de etanol, incluidos en parafina, seccionadas en láminas con un espesor de 5-6  $\mu\text{m}$ , y

teñidas con hematoxilina-eosina, tinción de Mallory y ácido peryódico de Schiff (PAS). Todas las muestras fueron evaluadas por duplicado por el mismo patólogo experto, a 400x aumentos, siguiendo el criterio de la Tabla 6:

Parámetro histológico	Valores
<b>Epitelio endometrial</b>	0: Normal. 1: Estructura normal pero con más de 5 células inflamatorias. 2: Presencia de membrana piógena.
<b>Infiltrado endometrial</b>	0: Ausencia (<3 PMN por campo microscópico a 400 x). 1: Baja (3-6 PMN por campo). 2: Moderada (7-10 PMN por campo). 3: Severa (>10 PMN por campo).
<b>Distribución infiltrado endometrial</b>	0: Ausente. 1: Periglandular (infiltrado en estrato esponjoso) 2: Difuso (infiltrado en estrato compacto). 3: Periglandular y difuso.
<b>Morfología glándulas endometriales</b>	0: Normales. 1: Dilatadas (>25% con luz superior a 2 veces altura epitelio). 2: Quísticas (>25% con dilatación y epitelio hipoplásico). 3: Dilatadas y quísticas.
<b>Fibrosis endometrial</b>	0: Ausente. 1: 1 o 2 capas concéntricas de fibroblastos. 2: 3-5 capas concéntricas de fibroblastos 3: >6 capas concéntricas de fibroblastos
<b>Distribución fibrosis</b>	0: Ausente. 1: Periglandular. 2: Difusa. 3: Periglandular y difusa.

Tabla 6.- Clasificación de las lesiones histológicas.

### Fluido intrauterino

El fluido intrauterino, de existir, fue identificado y evaluado en el momento de eliminar la rodaja de cuerno uterino. Las características de cualquier fluido existente fueron clasificadas en las siguientes categorías:

- 0= sin fluido
- 1= mucoso (moco transparente y cristalino)
- 2= anormal (mucopurulento, purulento o muco-sanguinolento)



### Muestras para la citología endometrial (imágenes 1 y 2)

Se introdujo un cytobrush en la porción más caudal del cuerno uterino, se procedió a rotar el cepillo sobre la superficie endometrial y, posteriormente, sobre un portaobjetos. Los frotis se tiñeron con la tinción Diff Quick® y se evaluaron con un microscopio a 400x aumentos, donde se contaron 250 células nucleadas para determinar el porcentaje de PMN. El punto de corte para considerar positiva la citología se estableció en  $\geq 5\%$  PMN. Todas las muestras fueron valoradas por duplicado y por la misma persona.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó empleando el programa informático SPSS 22.0 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA). En primer lugar, los resultados de bacteriología (cultivos positivos o negativos), los hallazgos histológicos (estado del epitelio, presencia y distribución del infiltrado, morfología de las glándulas, presencia y distribución de fibrosis), la presencia y el tipo de fluido intrauterino y la citología endometrial (positiva o negativa) se compararon mediante análisis de curvas ROC, empleando la citología endometrial como técnica de referencia (punto de corte:  $\geq 5\%$  PMN). Las variables que mediante el análisis con las curvas ROC indicaban una relación significativa con la citología se utilizaron a posteriori para una nueva comparación usando la Kappa de Cohen. El punto de corte utilizado en cada variable para este segundo análisis fue el que mostró una mayor sensibilidad y especificidad.

En segundo lugar, los resultados obtenidos de los cuernos uterinos derechos e izquierdos se compararon utilizando la Kappa de Cohen y/o el análisis de  $\text{Chi}^2$ . Finalmente, la relación entre los hallazgos citológicos, histológicos y bacteriológicos fueron evaluados mediante una  $\text{Chi}^2$ .

## Resultados

De los 100 tractos genitales empleados en este estudio, 73 se encontraban en fase luteínica y 27 en fase folicular. La fase del ciclo estral no tuvo ninguna influencia significativa ni en la citología endometrial, ni en los resultados microbiológicos, ni en la aparición de contenido intrauterino. La existencia de un infiltrado inflamatorio endometrial diagnosticado por histología (muestras de biopsia positivas, se especifica a continuación), fue el único parámetro en el que influyó la fase del ciclo estral ( $P < 0,001$ ), con 16,4% y 39,9% de biopsias positivas en la fase luteínica y folicular, respectivamente.

La presencia de infiltrado inflamatorio y la distribución del mismo en el endometrio fue el único parámetro histopatológico relacionado significativamente con los resultados de la citología endometrial. El estado del epitelio endometrial, la morfología de las glándulas endometriales o la existencia de fibrosis, así como la presencia de fluido intrauterino o el cultivo positivo, no tuvieron relación con los resultados citológicos. El análisis por curvas ROC para los parámetros evaluados se muestran en la tabla 7.

Parámetros comparados	ABC	Error	<i>p</i>
<b>Hallazgos histológicos</b>			
Estado del epitelio	.507	.060	.914
Morfología glandular	.426	.055	.229
Infiltrado inflamatorio	.780	.059	.000
Distribución del infiltrado	.694	.056	.002
Fibrosis endometrial	.557	.056	.351
Distribución de la fibrosis	.476	.056	.695
Bacteriología	.495	.061	.931
Contenido uterino	.593	.064	.131

Tabla 7. Análisis de curvas ROC: La histología endometrial, bacteriología y contenido uterino se evaluaron utilizando la citología como técnica de referencia (punto de corte  $\geq 5\%$  PMN en la muestra evaluada al microscopio a 400x) ( $n=200$ ). (ABC: Área bajo la curva).

Los úteros en los que se había diagnosticado por histología un infiltrado inflamatorio, independientemente del grado y distribución de la inflamación, fueron reclasificadas como muestras positivas en la biopsia (valores de corte indicados por los valores máximos de sensibilidad y especificidad de los análisis con las curvas ROC) y los resultados se volvieron a comparar con la citología empleando el método Kappa de Cohen. Se observó una moderada concordancia (sensibilidad: 69%; especificidad: 87%; Kappa=0,55±0,07) entre la citología uterina y la biopsia, en relación a la presencia de inflamación endometrial (figura 6) y un bajo grado de concordancia (Kappa=0,30±0,06) en relación a la distribución del infiltrado (figura 7).

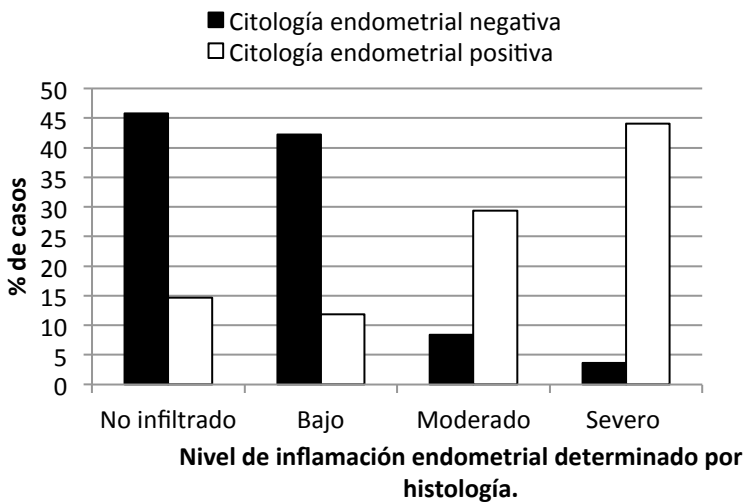
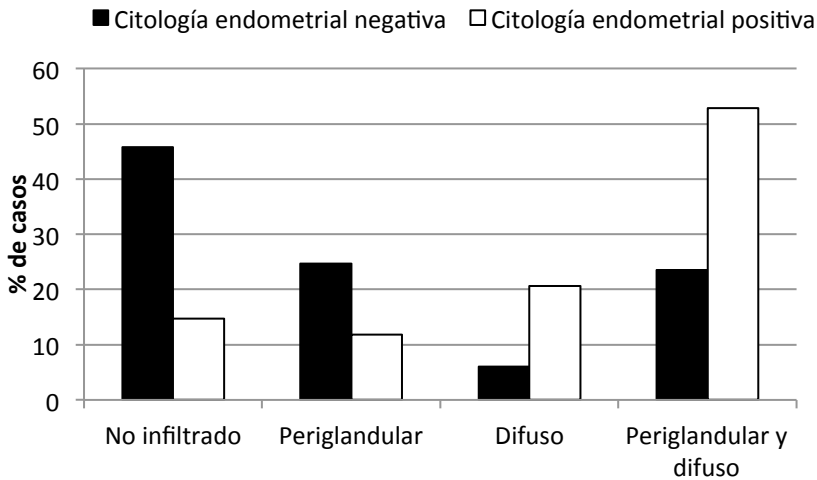


Figura 6. Comparación entre la citología endometrial y la histología en función del grado de inflamación.



**Distribución del infiltrado determinada por histología**

*Figura 7. Comparación entre la citología endometrial y la histología en función de la distribución del infiltrado.*

Quando se compararon los resultados entre las parejas de cuernos uterinos (figura 8) se apreció una concordancia moderadamente alta (Kappa=0,65±01,0). Así, en el 92% de los casos una citología negativa del cuerno izquierdo indicaba una citología negativa en ambos cuernos, mientras que el 20% de las citologías negativas en el cuerno derecho se correspondía con citología positiva en el cuerno izquierdo. Por su parte, cuando se compararon las biopsias en ambos pares de cuernos fue cuando se observaron los niveles más elevados de concordancia (Kappa=0,74±0,08), y de nuevo, el cuerno izquierdo era más representativo del estado de ambos cuernos que el cuerno derecho (figura 9).

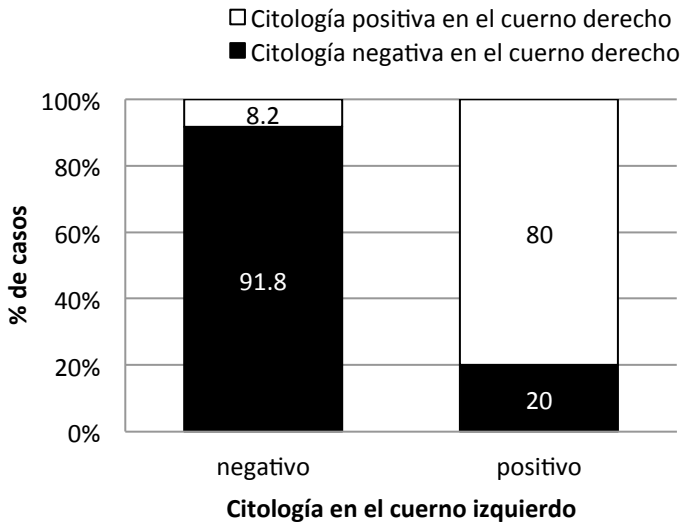


Figura 8. Comparación de los resultados de la citología endometrial entre los dos cuernos uterinos.

En lo concerniente a los hallazgos histológicos en ambos pares de cuernos, el grado de inflamación y la distribución de la misma eran coincidentes en su mayoría en ambos cuernos uterinos ( $P < 0,01$ ).

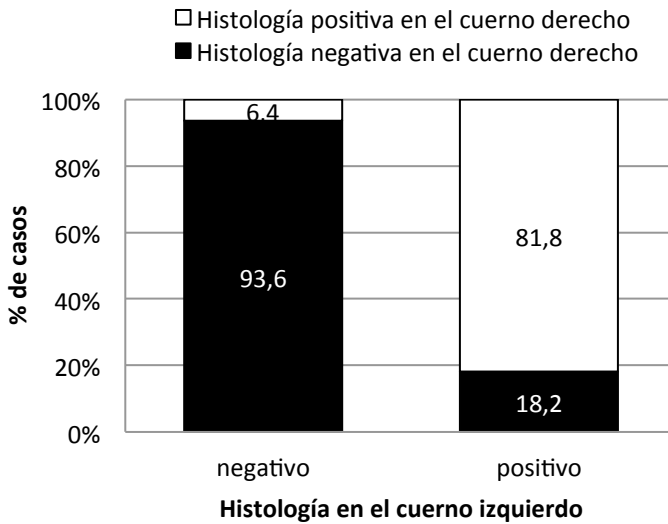


Figura 9. Comparación de los resultados de la biopsia endometrial entre los dos cuernos uterinos.

Cuando no se observaba, o simplemente se apreciaba un bajo grado de inflamación endometrial en el cuerno izquierdo, en el 83% de casos, se obtenía el mismo resultado en el cuerno derecho. Destacar que las inflamaciones endometriales severas siempre fueron observadas en ambos cuernos. Sin embargo, las mayores discrepancias entre cuernos fueron vistas en aquellos casos de inflamación endometrial moderada, de las cuales sólo el 58% fueron diagnosticadas en los dos cuernos (figura 10). En más del 85% de los casos, el infiltrado inflamatorio estuvo distribuido de forma similar en el endometrio de ambos cuernos uterinos (figura 11).

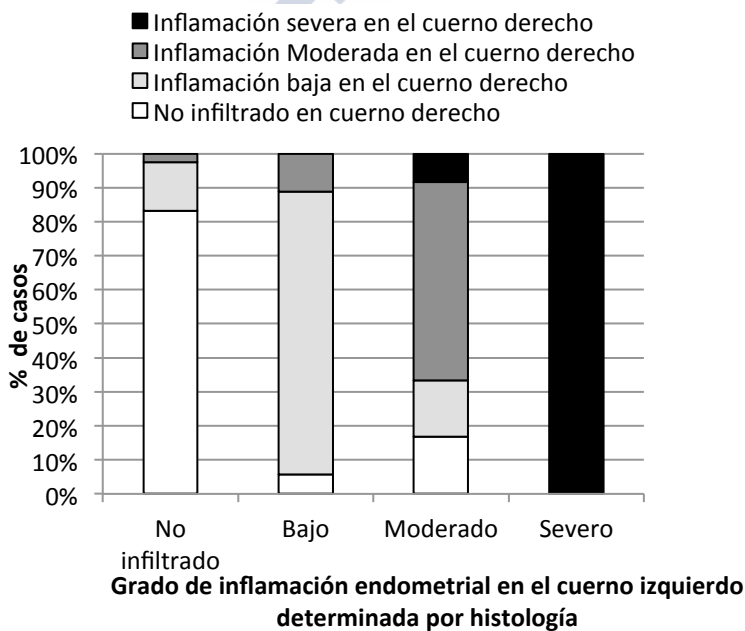


Figura 10. Comparación entre los dos cuernos uterinos en función del grado de inflamación endometrial determinada por histología.

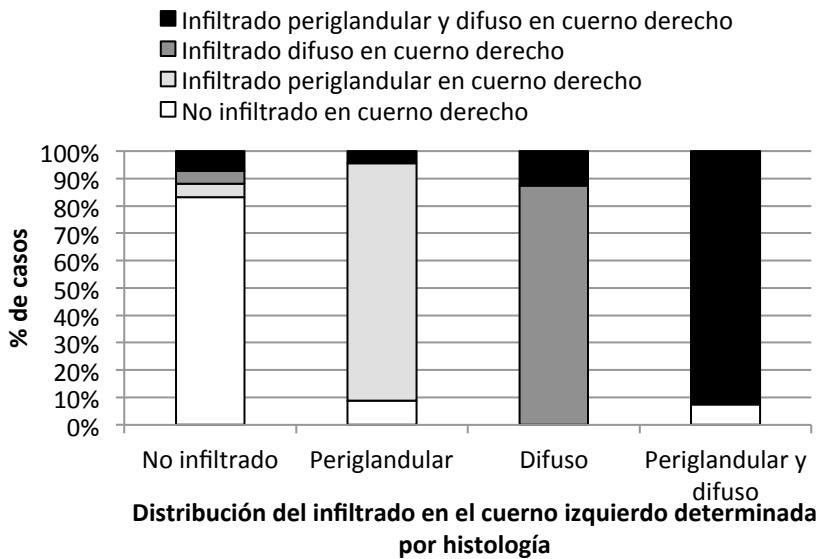
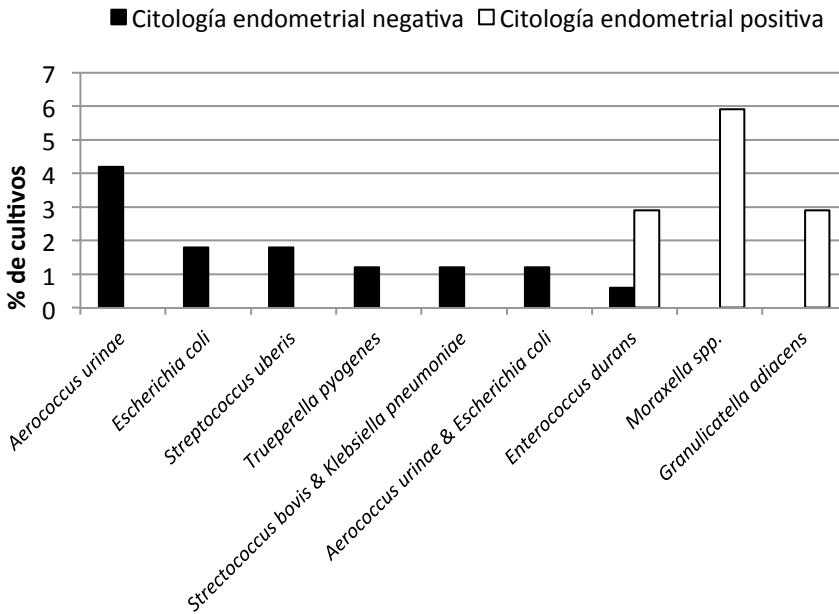


Figura 11. Comparación entre los dos cuernos uterinos en función de la distribución del infiltrado determinada por histología.

No hubo relación entre la citología o la biopsia con los resultados de bacteriología. Se obtuvieron cultivos positivos en el 11,8% de los cuernos que presentaban citologías y biopsias positivas, y el 12,3% en cuernos con resultados de citología o biopsia negativos. Curiosamente, se aislaron diferentes microorganismos de cuernos con citologías negativas o positivas (figura 12). Ambos pares de cuernos fueron bacteriológicamente negativos en el 83% de los casos y positivos sólo en el 7%. Cuando eran positivos, se aislaron las mismas bacterias de ambos cuernos. En el 10% de los casos, el cuerno derecho era negativo mientras que el cuerno izquierdo presentaba resultados bacteriológicos positivos, pero todos los cuernos uterinos izquierdos negativos se correspondieron con el mismo resultado en el cuerno derecho. Todas las muestras fueron negativas para los virus IBR, BVDV, BoHV4.



**Microorganismos aislados de los cultivos positivos**

Figura 12. Microorganismos aislados de los cultivos positivos en función del resultado de la citología

La presencia y las características del contenido uterino no difirieron entre muestras con citologías positivas o negativas. Sin embargo, se encontró una relación significativa ( $P=0,036$ ) entre el contenido uterino y los resultados de la biopsia. La ausencia de contenido intrauterino fue encontrado en el 67,1% de los cuernos que presentaban una biopsia negativa y en el 55,8% de los cuernos con biopsias positivas. Se encontró un moco limpio y transparente en el 21,1% de los cuernos con biopsias negativas y en un 16,3% de cuernos con biopsias positivas. Además se observó un contenido uterino anormal (mucopurulento, purulento o sanguinolento) en el 11,8% de los cuernos con biopsia negativa y en el 27,9% de los que presentaban biopsias positivas.



## Discusión

### *Concordancia entre los métodos de diagnóstico*

De los parámetros histológicos evaluados en la biopsia uterina, la presencia de infiltrado inflamatorio y su distribución endometrial estuvieron significativamente correlacionados con los resultados de la citología (tabla 7). Tales correlaciones parecen bastante evidentes ya que las células inflamatorias recogidas de la superficie uterina mediante el cytobrush proceden del endometrio (Sheldon et al., 2009; Shao et al., 2012) y, aunque una citología negativa no puede excluir la existencia de una inflamación endometrial, se debería esperar una elevado grado de concordancia entre la citología y la biopsia.

Sin embargo, en el presente estudio los resultados mostraron que el grado de concordancia entre ambos métodos era moderada para la presencia de inflamación ( $\kappa=0,55$ ) y baja para la distribución de los infiltrados ( $\kappa=0,30$ ). Meira et al. (2012) y Madoz et al. (2014) también encontraron una concordancia moderada ( $\kappa=0,39$ ) y baja ( $\kappa=0,151$ ), respectivamente, entre la citología uterina y la biopsia para el diagnóstico de la inflamación endometrial. Esta discrepancia entre los métodos de diagnóstico podría explicarse, al menos en parte, por el hecho de que la citología no pudo identificar la mayoría de las muestras con un bajo grado de inflamación (figura 6). Además, dado que la citología sólo evalúa la capa superficial del endometrio, se podría obtener una citología negativa de muestras uterinas con infiltrado inflamatorio en capas más profundas. De hecho, hemos observado que cuando el infiltrado inflamatorio tenía una distribución periglandular en el extracto esponjoso la citología era negativa en aproximadamente el 66% de los casos (figura 7).

Por otro lado, el valor del punto de corte del %PMN establecido para considerar una citología positiva podría haber influido en la correspondencia entre las dos técnicas, ya que encontramos que aproximadamente el 15% de úteros diagnosticados como sanos por histología eran clasificados como positivos en citología.

En nuestro estudio, al igual que ya había descrito Madoz et al. (2013), los resultados de la citología no se vieron afectados por la fase del ciclo estral en el momento del diagnóstico. Sin embargo, al emplear la biopsia, se podría detectar un mayor grado de infiltración inflamatoria durante la fase folicular del ciclo.

Por otra parte, hay que señalar que otras características evaluadas en este estudio, como por ejemplo la dilatación quística de las glándulas endometriales o la fibrosis endometrial, no mostraron correlación con los resultados de las citologías. Esto era de esperar, ya que la mayoría de las lesiones inflamatorias observadas aquí no involucraban a las glándulas endometriales. En el estudio de Meira et al. (2012) la biopsia uterina se mostró como un método diagnóstico más eficiente para ES al compararla con la citología uterina, cuando el nivel de inflamación glandular era excluido de la evaluación histológica. Esto parece sugerir que las endometritis crónicas, que típicamente implican glándulas quísticas y fibrosis periglandular (Ahmadi et al., 2005) podrían no ser detectadas por citología.

En otro orden de cosas, la presencia de fluido intrauterino, ya fuera normal o anormal, no tuvo relación con los resultados de la citología. En estudios previos, la presencia de fluido uterino detectado a través de ecografía estaba asociado con efectos negativos sobre la fertilidad (Kasimanickam et al., 2004;

Barlund et al., 2008), sin embargo tenía baja sensibilidad y la concordancia con la citología endometrial era baja, con valores de Kappa menores de 0,35 (Kasimanickam et al., 2004; Barlund et al., 2008; Meira et al., 2012). Debe tenerse en cuenta que la evaluación ecográfica del fluido uterino puede conducir a algunos errores de diagnóstico ya que la existencia de algún líquido en el interior del útero puede ser normal durante el período de estro o cuando la involución uterina es incompleta, lo que podría explicar parcialmente la baja concordancia con la citología.

En el presente estudio se ha determinado falta de concordancia entre la existencia de fluido anormal en el interior del útero y la citología. Kasimanickam et al. (2004) sugirieron que la citología y los ultrasonidos miden diferentes factores causales, así la citología mediría la respuesta celular, mientras que la ecografía valoraría los mecanismos de limpieza del útero. Sin embargo, en este estudio, se ha observado una relación significativa entre la presencia de contenido uterino y las muestras positivas a la biopsia, lo que sugiere que la citología no fue suficientemente sensible.

En resumen, los resultados del presente estudio indican que la citología falla a la hora de detectar casos de endometritis subclínica con bajo grado de inflamación o con una distribución de la infiltración predominantemente periglandular. El examen histopatológico de las biopsias proporciona una información mucho más detallada sobre el grado de inflamación y sobre las lesiones que pueden existir (Meira et al., 2012) y probablemente debería ser considerado el método de referencia para el diagnóstico de las ES. Sin embargo, la citología uterina mostró un grado de concordancia moderadamente alto y es más rápido y fácil de realizar y, probablemente, más

---

seguro que la biopsia uterina. Por lo tanto, la citología puede ser considerada una herramienta útil para el diagnóstico de las ES.

### *Comparación entre cuernos*

Una de las preocupaciones a la hora de realizar un diagnóstico es que las muestras tanto para realizar una citología endometrial como para una biopsia se recogen, normalmente, de un único cuerno uterino, asumiendo que la muestra debería ser representativa de ambos cuernos. Los resultados del presente estudio demuestran que esta asunción es, en general, verdadera, aunque no siempre.

Así, cuando la muestra para realizar una citología o una biopsia era tomada del cuerno izquierdo, un resultado negativo indicaba que, en más del 90% de los casos, el cuerno derecho también era negativo. Sin embargo, cuando la muestra procedía del cuerno derecho, en aproximadamente el 20% de los casos negativos el cuerno izquierdo era positivo. Era de esperar un cierto desacuerdo entre ambos cuernos uterinos en la citología y en la biopsia, ya que la inflamación endometrial puede ser local o difusa y podría no afectar, necesariamente, a todo el endometrio. Sin embargo, el motivo por el que la muestra del cuerno izquierdo parece ser más representativa que la tomada del cuerno derecho es desconocido. Ignoramos la existencia de estudios que comparen la citología o la biopsia entre ambos cuernos uterinos. Por lo tanto, esto podría deberse a un hallazgo ocasional, pero de ser confirmado en nuevos trabajos, debería ser tenido en cuenta a la hora de realizar el diagnóstico de las ES.

### Microbiología uterina

Curiosamente, el aislamiento bacteriano no presentó ninguna correlación significativa con los resultados de la citología o de la biopsia. Sólo unos pocos estudios han sido diseñados para investigar la población de bacterias presentes en el útero de vacas con ES (Lazzari et al., 2011; McDougall et al., 2011; Madoz et al., 2014) y, en general, se observaron bajos niveles de concordancia entre la presencia de patógenos intrauterinos y las endometritis citológicas. Parece que los efectos negativos de las ES en la fertilidad son más consecuencia de la inflamación uterina que de la infección bacteriana (Green et al., 2009; Burke et al., 2010; McDougall et al., 2011).

Hay que destacar que las diferentes especies bacterianas fueron aisladas tanto de los úteros con citología negativa como positiva. Mientras que de los cuernos uterinos con citologías negativas se aislaron algunos gérmenes patógenos conocidos, tales como *E. coli* y *T. pyogenes* (Sheldon et al., 2002; 2010; Amos et al., 2014), en los cuernos con citologías positivas se encontraron gérmenes no específicos o bacterias con baja patogenicidad. Estos hallazgos están de acuerdo con estudios previos que mostraban que una gran diversidad microbiana puede ser identificada en el útero de vacas lecheras, independientemente del estado de salud de su útero (Santos et al., 2011). Los mecanismos naturales de defensa eliminan muchos de los microorganismos pero la eficacia de la eliminación depende de la carga bacteriana y de la patogenicidad, así como del estado inmunitario de la vaca (Sheldon et al., 2002).

En lo que concierne a los resultados bacteriológicos del par de cuernos uterinos, de nuevo el cuerno izquierdo fue más representativo del estado de infección del útero que el cuerno derecho. Tal y como previamente ha sido

comentado para la citología y la biopsia, no hay una explicación clara para este hallazgo que debería ser investigado con más profundidad.

En conclusión, aunque la biopsia endometrial podría ser, en la actualidad, el método más preciso para el diagnóstico de la ES, nuestros resultados indican una concordancia moderadamente buena entre la citología y la biopsia ( $Kappa=0,55$ ), lo que ratifica la utilidad de la citología. De todas formas, la existencia de muestras de citologías endometriales y/o biopsia positivas no indican la existencia de una infección bacteriana. Además, debe señalarse que en la mayoría de los casos (pero no en el 100%) los resultados de la citología, la biopsia y la bacteriología fueron similares en ambos cuernos uterinos. Finalmente, el hecho de que el cuerno izquierdo pueda ser más representativo del estado de salud del útero que el derecho todavía tiene que ser confirmado.

Agradecimientos: Este estudio está subvencionado por la Xunta de Galicia (Proyecto RUMIGAL: Rede de estudio multidisciplinar dos ruminantes de Galicia).

### **Bibliografía**

Ahmadi, M.R.; Khodakaram Tafti, A.; Nazifi, S.; Ghaisari, H.R. (2005). The comparative evaluation of uterine and cervical mucosa cytology with endometrial histopathology in cows. *Comp. Clin. Path.* 14: 90-94.

Amos, M.R.; Healey, G.D.; Goldstone, R.J.; Mahan, S.M.; Duvel, A.; Schuberth, H.J.; Sandra, O.; Zieger, P.; Dieuzy-Labaye, I.; Smith, D.G.; Sheldon, I.M. (2014). Differential endometrial cell sensitivity to a cholesterol-dependent cytolysin links *Trueperella pyogenes* to uterine disease in cattle. *Biol. Reprod.* 90: 1-13.

Barlund, C.S.; Carruthers, T.D.; Waldner, C.L.; Palmer, C.W. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*. 69: 714-723.

Barrio, M.; Vigo, M.; Quintela, L.A.; Becerra, J.J.; Herradón, P.G.; Martínez-Bello, D.; Fernández-Sánchez, F.; Prieto, A.; Cainzos, J.; Peña, A.I. (2015). Influence of subclinical endometritis on the reproductive performance of dairy cows. *SJAR* 13(4): e05SC02.

Bartlett, P.C.; Kirk, J.H.; Wilke, M.A.; Kaneene, J.B.; Mather, E.C. (1986). Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian Cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Prev. Vet. Med.* 4: 235-248.

Burke, C.R.; Meier, S.; McDougall, S.; Compton, C.; Mitchell, M.; Roche, J.R. (2010). Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 5363-5373.

Carter, G.R.; Cole, J.R. (1990). *Diagnostic procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology*. Academic Press. San Diego, California.

Földi, J.; Kulcsara, M.; Pecsí, A.; Huygheb, B.; de Sa, C.; Lohuis, J.A.C.M.; Cox, P.; Huszenicza, G. (2006). Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 96: 265-281.

Gilbert, R.O.; Shin, S.T.; Guard, C.L.; Erb, H.N.; Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 64: 1879-1888.

Green, M.P.; Ledgard, A.M.; Berg, M.C.; Peterson, A.J.; Back, P.J. (2009). Prevalence and identification of systemic markers of sub-clinical endometritis in postpartum dairy cows. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 69: 37-42.

Guard, C.L. (1994). Costs of clinical disease in dairy cows. Presented at: the Annual Cornell Conference on Veterinary Medicine. Ithaca, NY.

Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 62: 9-23.

Kasimanickam, R.; Duffield, T.F.; Foster, R.A.; Gartley, C.J.; Leslie, K.E.; Walton, J.S.; Johnson, W.H. (2005). The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology*. 63: 818-830.

Koneman, E.; Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P.; Woods, G. (2006). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore.

Küçükaslan, I.; Kaya, D.; Emre, B.; Bollwein, H.; Özyurtlu, N.; Mülazımoğlu, S.B.; Aslan, S. (2014). Evaluation of endometrial echotexture and cervical cytology in cows during and after treatment of endometritis. *Tierärztl. Prax.* 42 (G): 343-350.

Lazzari, G.; Duchi, R.; Colleoni, S.; Baldazzi, L.; Benedetti, V.; Galli, A.; Luini, M.; Ferrari, M.; Galli, C. (2011). Le patologie uterine cliniche e subcliniche come



causa di infertilità nelle bovine da latte: studio epidemiologico in due allevamenti della regione Lombardia. *Large Anim. Rev.* 17: 43-47.

Lee, G.; Luna, H.T. (1968). *Manual of histological staining methods of the armed forces institute of pathology*. McGraw-Hill.

López-Gatius, F. (2003). Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology*. 60: 89-99.

Lucy, M.C. (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End?. *J. Dairy Sci.* 84: 1277-1293.

Madoz, L.V.; Giuliadori, M.J.; Jaureguiberry, M.; Plontzke, J.; Drillich, M.; de la Sota, R.L. (2013). The relationship between endometrial cytology during estrus cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96 (7): 4333-4337.

Madoz, L.V.; Giuliadori, M.J.; Migliorisi, A.L.; Jaureguiberry, M.; de la Sota, R.L. (2014). Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97: 1-7.

McDougall, S.; Husseina, H.; Aberdein, D.; Buckle, K.; Roche, J.; Burke, C.; Mitchell, M.; Meier, S. (2011). Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*. 76: 229-240.

Meira, Jr. E.B.S.; Henriques, L.C.S.; Sá, L.R.M.; Gregory, L. (2012). Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 95: 6969-6973.

Melcher, Y.; Prunner, I.; Drillich, M. (2014). Degree of variation and reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. *Theriogenology*. 82: 57-63.

Oral, H.; Sozmen, M.; Serin, G.; Kaya, S. (2009). Comparison of the cytobrush technique, vaginoscopy and transrectal ultrasonography methods for the diagnosis of postpartum endometritis in cows. *J. Anim. Vet. Adv.* 8: 1252-1255.

Plazier, J.C.B.; King, G.J.; Dekkers, J.C.M.; Lissemore, K. (1997). Estimation of economic values of indices for reproductive performance in dairy herds using computer simulation. *J. Dairy Sci.* 80: 2775-2783.

Prieto, M.; Barrio, M.; Quintela, L.A.; Perez-Martin, C.C.; Becerra, J.J.; Vigo, M.; Diaz, C.; Cainzos, J.; Prieto, A.; Fernandez, F.I.; Martinez, D.; Herradon, P.G. (2012). Validation of simple method for the interpretation of uterine cytology in cows. *Vet. Med.* 57: 360-363.

Royal, M.; Mann, G.E.; Flint, A.P. (2000). Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *Vet. J.* 160(1): 53-60.

Santos, T.M.A.; Gilbert, R.; Bicalho, R.C. (2011). Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 291-302.

Schukken, Y.H.; Zurakowski, M.J.; Rauch, B.J.; Gross, B.; Tikofsky, L.L.; Welcome, F.L. (2013). Noninferiority trial comparing a first-generation cephalosporin with a third-generation cephalosporin in the treatment of nonsevere clinical mastitis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81: 6763-6774.

Shao, C.Y.; Wang, H.; Meng, X.; Zhu, J.Q.; Wu, Y.Q.; Li, J.J. (2012). Characterization of the innate immune response in goats after intrauterine infusion of *E. coli* using histopathological, cytologic and molecular analyses. *Theriogenology*. 78: 593-604.

Sheldon, I.M.; Cronin, J.; Goetze, L.; Donofrio, G.; Schuberth, H.J. (2009). Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract. *Cattle Biol. Reprod.* 81: 1025-1032.

Sheldon, I.M.; Lewis, G.S.; LeBlanc, S.; Gilbert, R.O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*. 65: 1516-1530.

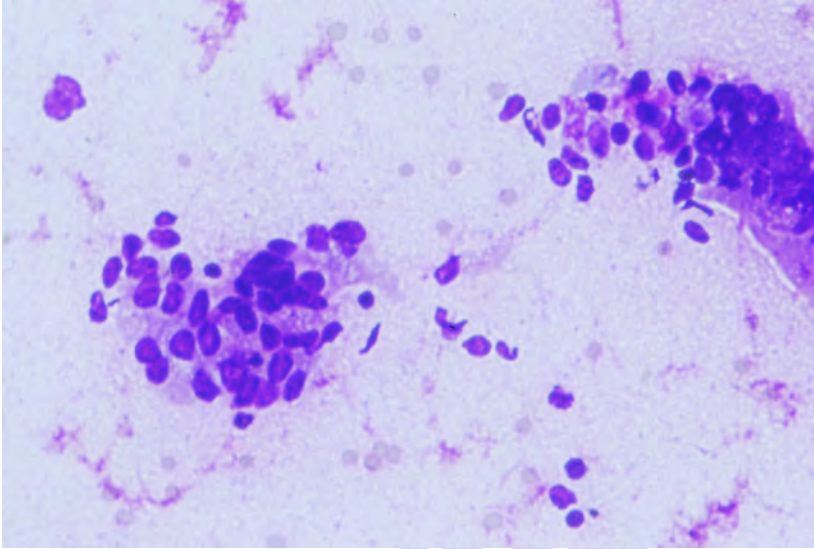
Sheldon, I.M.; Noakes, D.E.; Rycroft, A.N.; Pfeiffer, D.U.; Dobson, H. (2002). Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction*. 123: 837-845.

Sheldon, I.M.; Rycroft, A.N.; Dogan, B.; Craven, M.; Bromfield, J.J.; Chandler, A. Roberts, M.H.; Price, S.B.; Gilbert, R.O.; Simpson, K.W. (2010). Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *Plos One*. 5: e9192.

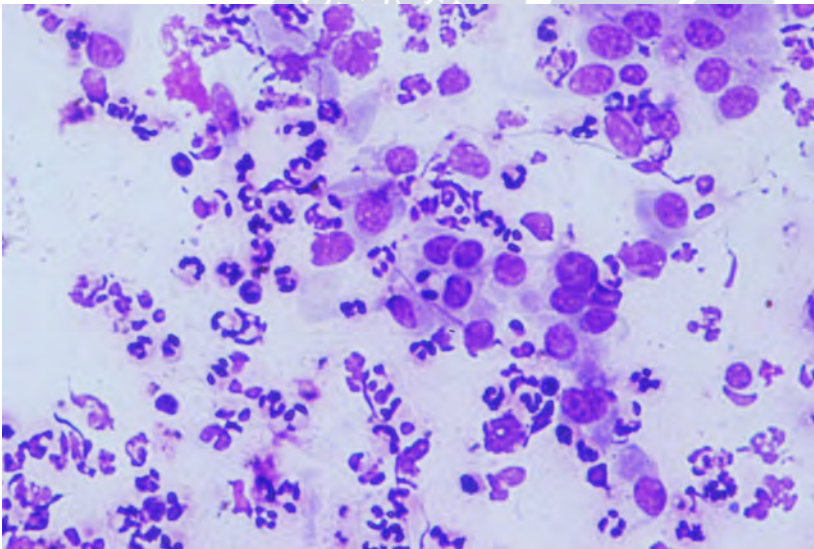
Walsh, S.W.; Williams, E.J.; Evans, A.C.O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 123: 127-138.

**Anexo: Imágenes.**

**Citología:**

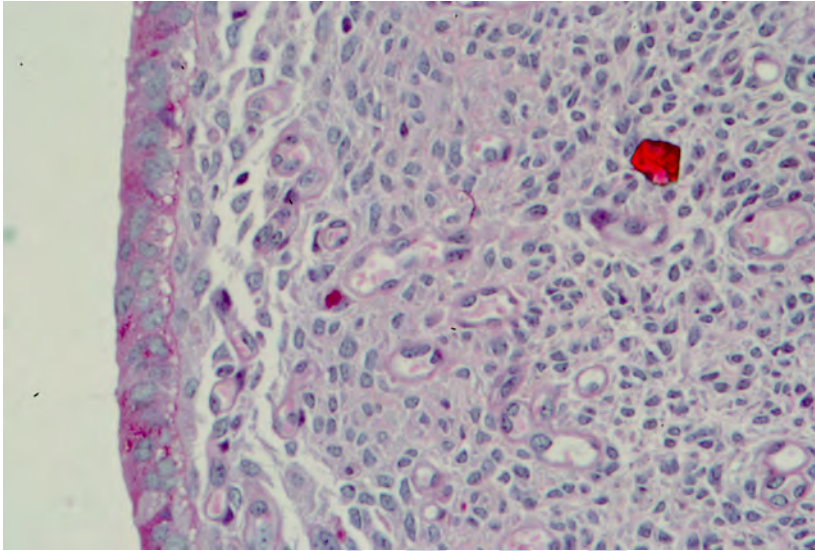


*Imagen 1.- Citología negativa.*

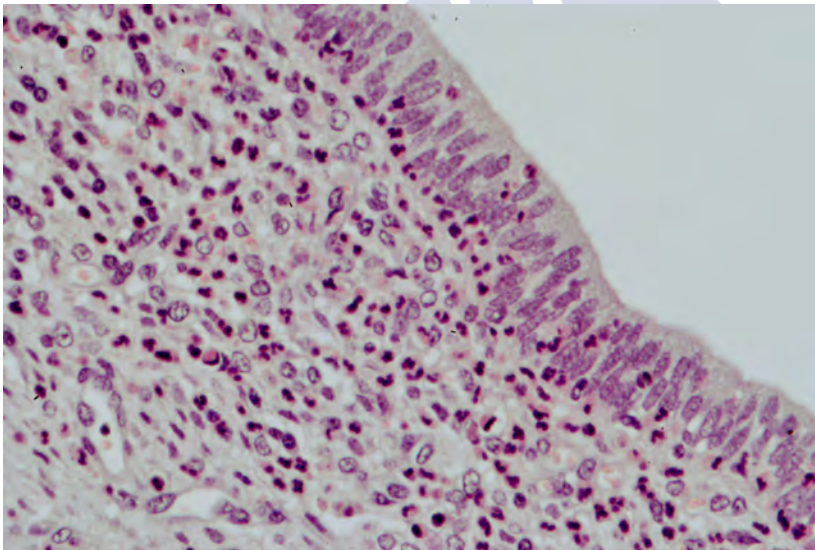


*Imagen 2.- Citología positiva.*

**Histología:**

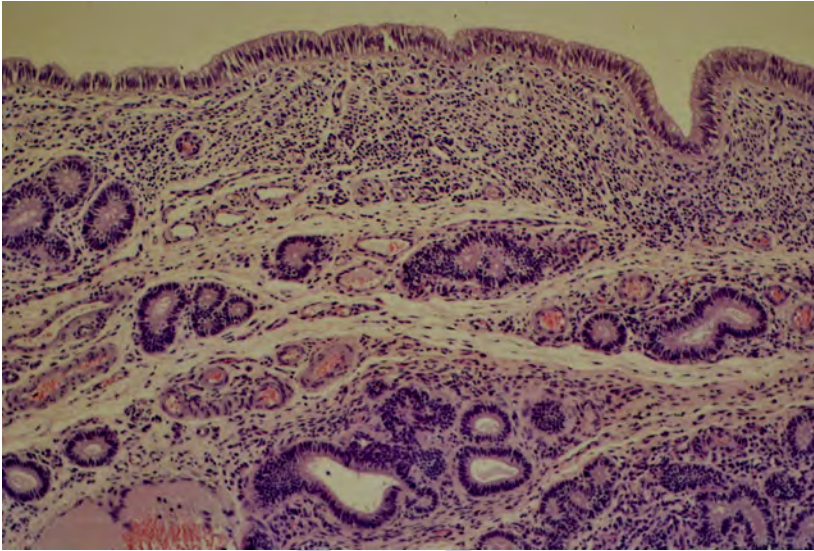


*Imagen 3.- Epitelio y endometrio normales*

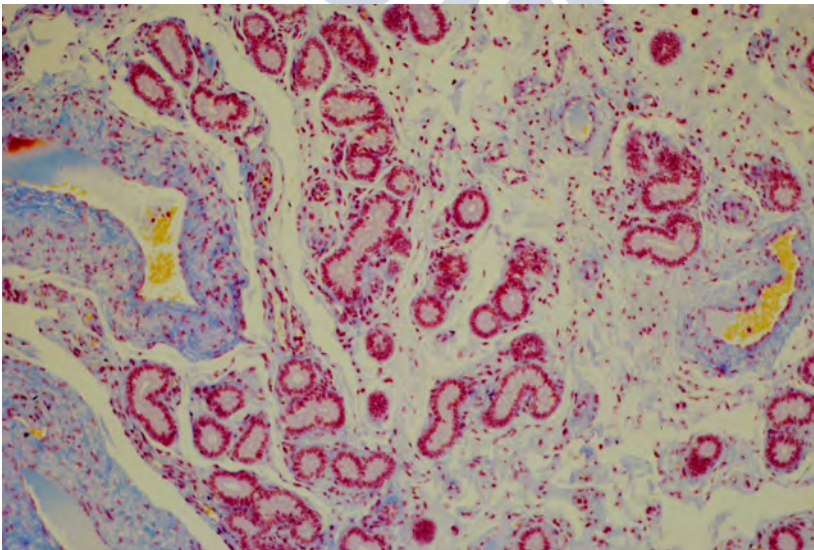


*Imagen 4.- Epitelio y endometrio infiltrado.*

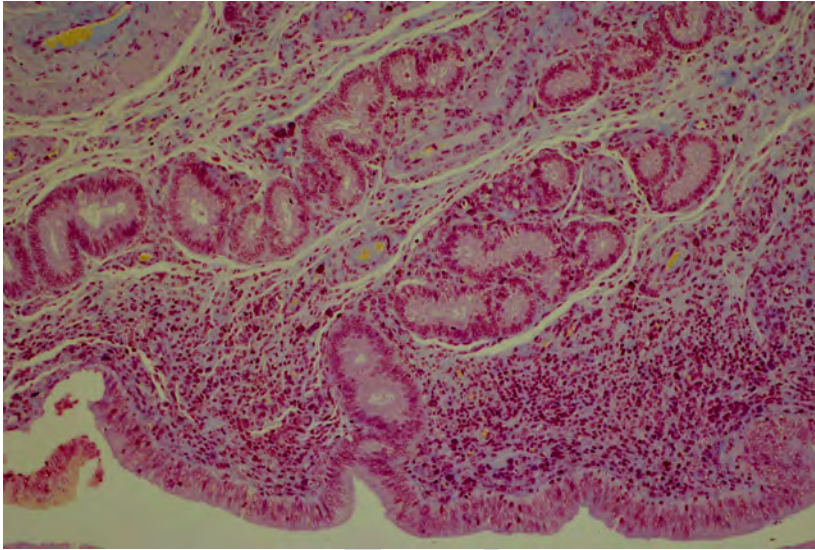




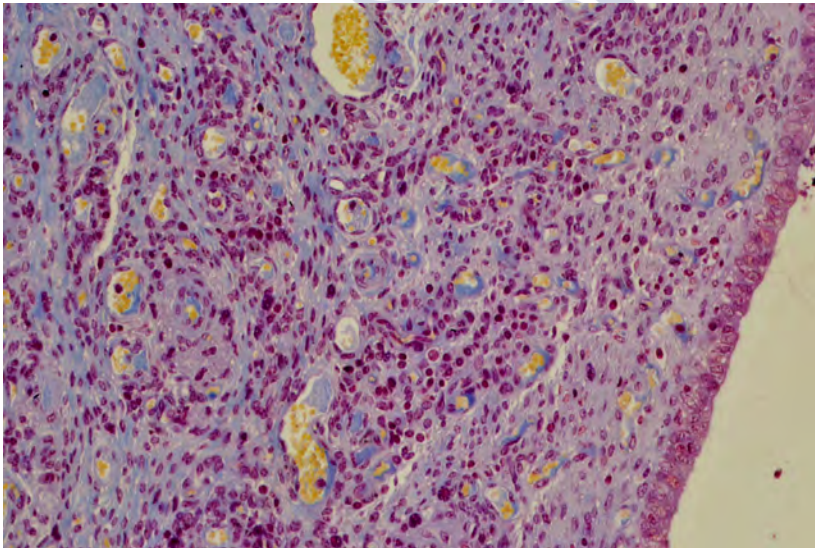
*Imagen 5.- Epitelio normal e infiltrado endometrial difuso y periglandular*



*Imagen 6.- Ausencia de fibrosis.*

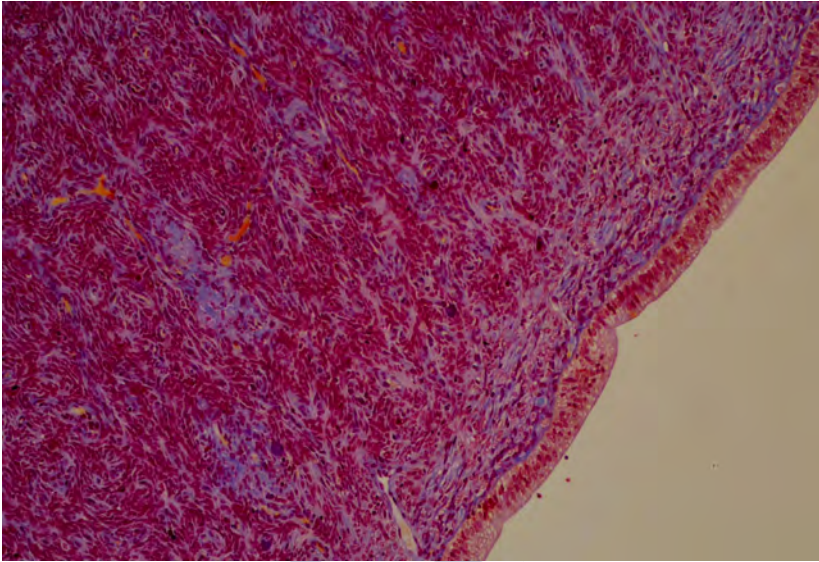


*Imagen 7.- Ausencia de fibrosis e infiltrado endometrial abundante.*

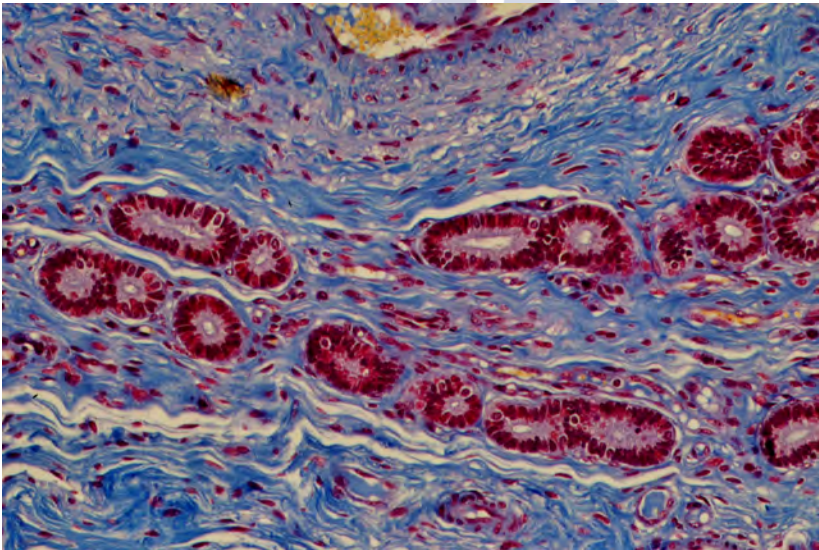


*Imagen 8.- Fibrosis difusa grado 2.*





*Imagen 9.- Epitelio y endometrio muy infiltrados y fibrosis difusa grado 3.*



*Imagen 10.- Fibrosis difusa grado 3 y glándulas normales.*



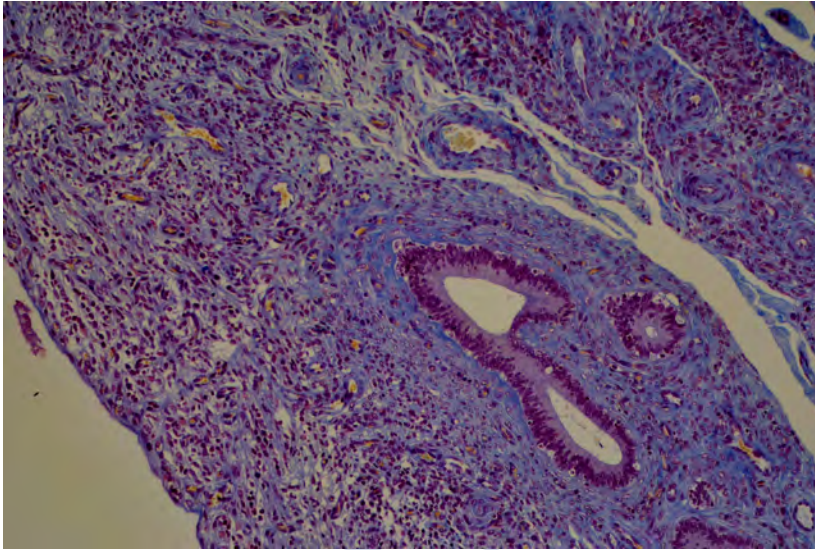


Imagen 11.- Fibrosis periglandular grado 3.

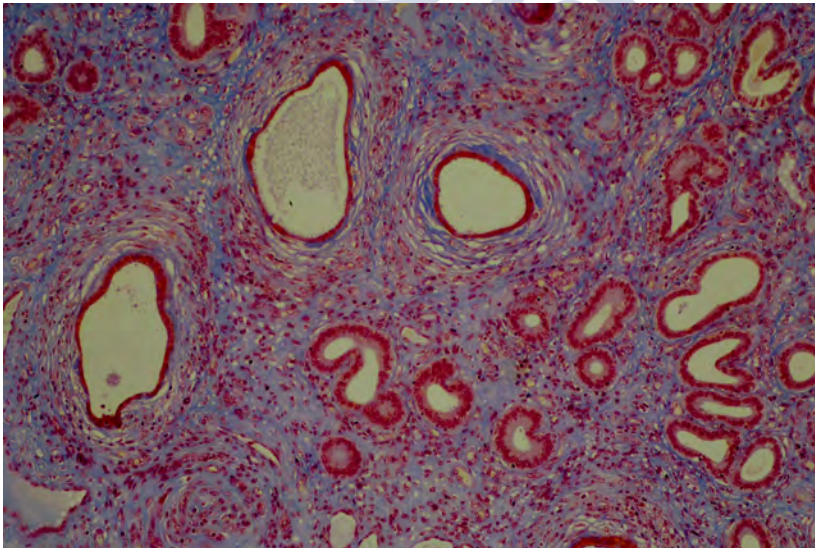
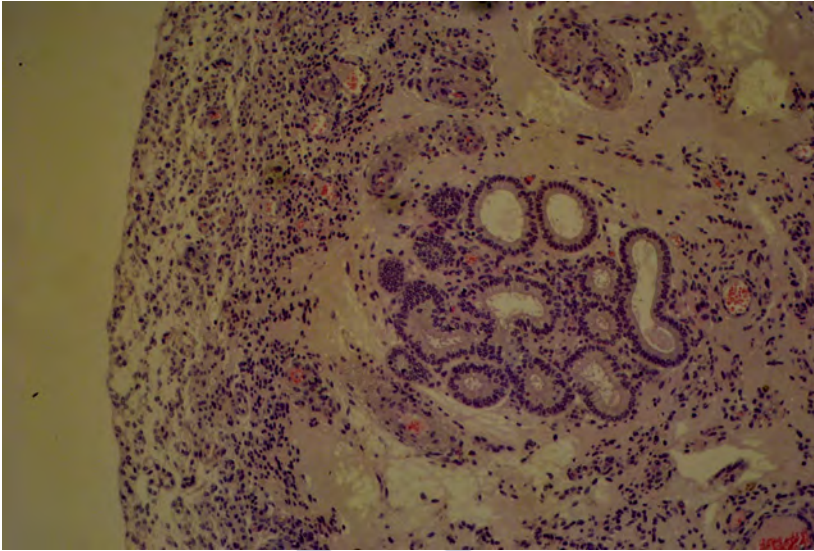


Imagen 12.- Fibrosis periglandular grado 3 y glándulas dilatadas y quísticas.



*Imagen 13.- Glandulas dilatadas, ausencia de epitelio, infiltrado endometrial y periglandular.*







## **CONCLUSIONES**



- 1.- La prevalencia de endometritis subclínicas encontrada en este trabajo entre los días 30 y 45 es relativamente baja (15%) aunque relevante desde el punto de vista de sus efectos sobre la reproducción.
- 2.- Las endometritis subclínicas mostraron un efecto negativo sobre el rendimiento reproductivo, reduciendo la fertilidad y alargando el intervalo entre el parto y la gestación.
- 3.- Una parte importante de los animales que padecen endometritis subclínicas no pueden ser diagnosticados por exploración rectal, ni empleando un vaginoscopio ni por ecografía, haciendo necesario el uso de otros métodos: citología o histología.
- 4.- El diagnóstico de la endometritis (clínica o subclínica) puede ser llevado a cabo determinando la media de PMN en 10 campos, obteniendo la misma eficiencia que mediante el cálculo del porcentaje de PMN en 150 células. Es de destacar que el método aquí propuesto es más rápido y más fácil de llevar a cabo.
- 5.- Aunque la biopsia endometrial podría ser, en la actualidad, el método más preciso para el diagnóstico de la endometritis subclínica, nuestros resultados indican una concordancia moderadamente buena entre la citología y la biopsia ( $\kappa=0,55$ ), lo que ratifica la utilidad de la citología.
- 6.- En la mayoría de los casos (pero no en el 100%) los resultados de la citología, la biopsia y la bacteriología fueron similares en ambos cuernos uterinos.

7.- El cuerno izquierdo parece ser más representativo del estado general de salud del útero, si bien, este hecho necesita más estudios para ser confirmado.

8.- La existencia de muestras de citologías endometriales y/o biopsia positivas no indican la existencia de una infección bacteriana.





## **RESUMEN**





El objetivo general de este trabajo ha sido ampliar el conocimiento en algunos aspectos relativos a las endometritis subclínicas que actualmente aun son objeto de controversia: Su impacto en las explotaciones de vacuno lechero y su diagnóstico.

En el primer estudio de esta tesis, el objetivo fue evaluar la influencia de las endometritis subclínicas en el rendimiento reproductivo de vacas de aptitud láctea. Para ello se examinaron noventa y cuatro vacas de aptitud láctea de entre 1 y 8 partos, distribuidas en 25 rebaños. Los animales fueron explorados una vez entre los 30 y 45 días en leche empleando la palpación rectal, el vaginoscopio y la ecografía. Se tomó una muestra citológica del endometrio sólo en aquellas vacas con una aparente salud uterina (n=65). Además, se tomó una muestra sanguínea donde se analizaron los valores de glucosa, colesterol total, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados,  $\beta$ -hidroxibutirato, proteínas totales, albúmina, urea y de las enzimas hepáticas (ASAT y ALAT). A lo largo de los siguientes 11 meses se registraron los índices reproductivos de los animales. Se consideró a la citología endometrial como indicadora de endometritis subclínicas cuando el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos era superior al 5% de todas las células presentes en el frotis (excepto los eritrocitos). Los resultados indicaron que el 14,9% de las vacas muestreadas con la citología uterina tenían endometritis subclínicas, y que las vacas sanas quedaban preñadas significativamente antes que las que presentaban endometritis subclínica (hazard ratio=2,35; intervalo de confianza 95%: 1,05-5,3). De todas las variables metabólicas y productivas analizadas, sólo los triglicéridos afectaron negativamente a la reproducción; mientras que, la concentración de albumina sérica, la puntuación de la condición corporal y la producción láctea tuvieron un efecto positivo en el rendimiento

reproductivo. En conclusión, nuestros resultados indican que las endometritis subclínicas tienen un impacto negativo en el rendimiento reproductivo y es necesario emplear la citología uterina para diagnosticarla ya que casi un 15% de los animales afectados no fueron detectados por ninguno de los otros métodos de diagnóstico.

En el segundo trabajo, el objetivo fue valorar un método sencillo, basado en el cálculo del número medio de polimorfonucleares neutrófilos en 10 campos de observación a 1000x, para la evaluación de las citologías uterinas. Para ello, se realizaron doscientas sesenta citologías endometriales en vacas de raza Holstein en diferentes etapas del postparto empleando un cytobrush adaptado para su uso en esta especie. Los frotis así obtenidos fueron fijados al aire y teñidos con la técnica de Romanowsky. Para evaluar el método se calculó el porcentaje de PMN existente en 150 células, así como el número medio de PMN existente en 10 campos a 1000x. Se construyeron curvas ROC para evaluar el nuevo método, utilizando el porcentaje de neutrófilos como referencia y el número medio de neutrófilos como método a evaluar. Los resultados mostraron un área bajo la curva superior a 0.99 en todos los casos, lo que demuestra que este método, simple, puede ser utilizado para determinar el porcentaje de neutrófilos en las citologías endometriales y para el diagnóstico de las endometritis subclínicas.

En el último estudio, los objetivos han sido determinar: a) la concordancia existente entre citología endometrial, biopsia uterina y la presencia y tipo de contenido uterino en úteros macroscópicamente normales; b) la concordancia entre los resultados obtenidos de los dos cuernos uterinos empleando los diferentes métodos de diagnóstico; y c) la presencia y tipo de microorganismos aislados del útero con o sin endometritis citológica. Para ello, en un matadero

local se recogieron cien tractos genitales, macroscópicamente normales, de vacas Holstein. Las muestras para el análisis citológico, histopatológico y bacteriológico fueron obtenidas de ambos cuernos uterinos y la presencia de cualquier contenido intrauterino fue determinado tras la apertura de los cuernos uterinos. El punto de corte empleado para las citologías positivas fue  $\geq 5\%$  polimorfonucleares neutrófilos. Los datos fueron analizados mediante curvas ROC, el método de la kappa de Cohen y el test  $\chi^2$ . Los resultados mostraron una concordancia moderada entre la citología y la presencia de infiltrado en el endometrio, elevada entre los resultados de ambos cuernos uterinos y escasa con la bacteriología. Como conclusión final, podemos decir que la citología, a pesar de ser menos sensible que la biopsia, parece el mejor método para el diagnóstico de las endometritis citológicas por facilidad y rapidez en la obtención de los resultados.

**Palabras clave:** Vaca, Endometritis, Diagnóstico, Fertilidad, Citología, Histología, Micobiología.





## **RESUMO**



O obxectivo xeral deste traballo foi ampliar o coñecemento nalgúns aspectos relativos ás endometrites subclínicas que actualmente inda son obxecto de controversia: o seu impacto nas explotacións de vacún leiteiro e o seu diagnóstico.

No primeiro estudo desta tese, o obxectivo foi avaliar as influencias das endometrites subclínicas no rendemento reprodutivo das vacas de aptitude láctea. Para iso examináronse noventa e catro vacas de aptitude láctea que tiñan entre 1 e 8 partos, aloxadas en 25 rabaños. Os animais foron explorados unha vez entre os 30 e 45 días en leite empregando a palpación rectal, o vaxinoscopio e a ecografía. Tomouse unha mostra citolóxica do endometrio só nas vacas cunha aparente saúde uterina (n=65). Ademais, tomouse unha mostra sanguínea onde foron analizados os valores de glicosa, colesterol total, triglicéridos, ácidos graxos non esterificados,  $\beta$ -hidroxibutirato, proteínas totais, albúmina, urea e das enzimas hepáticas (ASAT e ALAT). Ó longo dos seguintes 11 meses foron rexistrados os índices reprodutivos dos animais. Considerouse á citoloxía endometrial como indicadora de endometrite subclínica cando a porcentaxe de polimorfonucleares neutrófilos era superior ó 5% de todas as células presentes no frotis (excepto os eritrocitos). Os resultados indicaron que o 14,9% das vacas nas que se realizou a citoloxía uterina tiñan endometrites subclínicas, e que as vacas sans quedan preñadas significativamente antes que as que presentaban endometrites subclínicas (hazard ratio=2,35; intervalo de confianza 95%: 1,05-5,3). De todas as variables metabólicas e produtivas analizadas, só os triglicéridos afectaron negativamente á reprodución; mentres que, a concentración de albúmina sérica, a puntuación da condición corporal e a produción láctea tiveron un efecto positivo no rendemento reprodutivo.



En conclusión, os nosos resultados indican que as endometrites subclínicas teñen un impacto negativo no rendemento reprodutivo e é necesario empregar a citoloxía uterina para diagnósticala xa que case un 15% dos animais afectados non foron detectados por ningún outro método de diagnóstico.

No segundo traballo, o obxectivo foi avaliar un método sinxelo, baseado no cálculo do número medio de polimorfonucleares neutrófilos en 10 campo de observación a 1000x, para avaliar citoloxías uterinas. Para iso, fixéronse duascenas sesenta citoloxías endometriais en vacas de raza Holstein en diferentes etapas do postparto empregando un cytobrush adaptado para o seu uso nesta especie. Os frotis así obtidos foron fixados ó aire e tinguidos coa técnica Romanowsky. Para avaliar o método foi calculada a porcentaxe de PMN existente en 150 células, así como o número medio de PMN existente en 10 campos a 1000x. Foron construídas curvas ROC para avaliar o novo método, empregando a porcentaxe de neutrófilos coma referencia e o número medio de neutrófilos como método a avaliar. Os resultados mostraron un área baixo a curva superior a 0,99 en todos os casos, o que demostra que este método, sinxelo, pode ser empregado para determinar a porcentaxe de neutrófilos nas citoloxías endometriais e para o diagnóstico das endometrites subclínicas.

No derradeiro estudo, os obxectivos foron determinar: a) a concordancia existente entre citoloxía endometrial, biopsia uterina e a presenza e tipo de contido en úteros macroscopicamente normais; b) a concordancia entre os resultados dos dous cornos uterinos empregando os diferentes métodos de diagnóstico; e c) a presenza e tipo de microorganismos illados do útero con o sen endometrites citolóxicas. Para iso, nun matadoiro local recolléronse cen tractos xenitais, macroscopicamente normais, de vacas Holstein. As mostras

para a análise citolóxica, histopatolóxica e bacteriolóxica recolléronse de ambos cornos uterinos e a presenza de calquera contido foi determinado trala apertura dos cornos. O punto de corte empregado para as citoloxías positivas foi  $\geq 5\%$  polimorfonucleares neutrófilos. Os datos foron analizados mediante curvas ROC, o método da kappa de Cohen e o test  $\chi^2$ . Os resultados mostraron unha concordancia moderada entre a citoloxía e a presenza de infiltrado no endometrio, elevada entre os resultados de ambos cornos uterinos e escasa coa bacterioloxía. Como conclusión final, podemos dicir que a citoloxía, a pesares de ser menos sensible que a biopsia, parece o mellor método para o diagnóstico das endometrites citolóxicas por facilidade e rapidez na obtención dos resultados.

**Palabras clave:** Vaca, Endometrite, Diagnóstico, Fertilidade, Citoloxía, Histoloxía, Microbioloxía







## **SUMMARY**



The general aim of this thesis has been to increase the current knowledge about some aspects related to subclinical endometritis in cows that are still controversial: its impact on dairy farms and its diagnosis.

The aim of the first study was to evaluate the influence of subclinical endometritis (SE) on the reproductive performance of dairy cows. Ninety-four dairy cows of parity 1 to 8, distributed in 25 herds, were examined once between 30 and 45 days in milk (DIM) using transrectal palpation, vaginoscopy and ultrasonography. A cytological sample of the endometrium was taken only from cows with an apparent healthy uterus (n=65). Serum glucose, total cholesterol, triglycerides, non-esterified fatty acids,  $\beta$ -hydroxybutyrate, total proteins, albumin, urea and hepatic enzymes were analyzed. Reproductive indexes were recorded during the next 11 months. Endometrial cytology was considered indicative of SE if percentage of polymorphonuclear neutrophils (PMN) was superior to 5% of all cells present in the smear, except erythrocytes. Results indicated that 14.9% of the cows sampled for uterine cytology had subclinical endometritis, and that healthy cows become pregnant significantly before than those with SE (HR= 2.35; 95%CI: 1.05-5.3). From all the metabolic and productive parameters analyzed, only triglycerides affected negatively to reproduction; serum albumin concentration, body condition score and milk production had positive effects on the reproductive performance. In conclusion, our results indicated that subclinical endometritis has a negative impact on reproductive performance and uterine cytology is necessary to diagnose it since almost 15% of the affected animals were not detected by other diagnosis methods.

In the second study, the aim was to assess whether a simple test, based on calculating the average number of PMN in 10 fields at 1000x, could be a

reliable technique for the diagnosis of endometritis. Two hundred and sixty endometrial samples were taken from Holstein cows at different postpartum stages using an adapted cytobrush. Smears obtained were air-dried and stained with a Romanowsky-type procedure. To evaluate the counting method, the percentage of PMN in 150 cells was calculated as well as the average number of PMN in 10 fields at 1000x. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to evaluate both methods, the percentage of PMN (used as reference) and the average number of PMN. It was observed that the area under the curve was higher than 0.99 regardless of the cut-off point used. These results showed that this simple method could be used to determine the percentage of PMN in endometrial cytological samples and to diagnose endometritis in cows.

In the last study, the objectives were to determine: a) the agreement between postmortem endometrial cytology, uterine biopsy and presence of intrauterine fluid in apparently normal genital tracts collected from culled dairy cows; b) the agreement between results obtained from paired uterine horns using the different diagnosis methods; and c) the microorganisms isolated from uteri with cytological endometritis. One hundred macroscopically normal genital tracts from Holstein cows were collected at a local slaughterhouse. Samples for cytology, histopathology and bacteriology were obtained from both uterine horns, and presence of any intrauterine content was determined after opening the tracts. Cut-off values used for positive cytology were  $\geq 5\%$  PMN. Data were analyzed by ROC curve analysis, Cohen's kappa method and  $\text{Chi}^2$  tests. Results showed moderately agreement between histology and cytology for presence of infiltrate (kappa=0.55), moderately high agreement between paired uterine horns for cytology (kappa=0.65) and biopsy (kappa=0.74) and no agreement between bacteriology and cytology or biopsy. It was concluded that

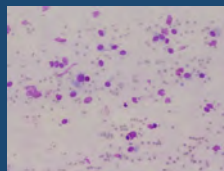
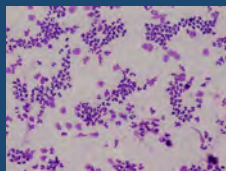
endometrial cytology, although less sensitive than biopsy, is an acceptable tool for diagnosing subclinical endometrial inflammation.

**Palabras clave:** Cow, Endometritis, Diagnosis, Fertility, Cytology, Histology, Microbiology.









## FACULTAD DE VETERINARIA

