**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACAS DE TAMBO: DIAGNÓSTICO,
PREVALENCIA E IMPACTO SOBRE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA**

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar por el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias**

Autor: MV, Laura Vanina Madoz

Director: MV, MSc, PhD, DECAR, Rodolfo Luzbel de la Sota

**Lugar de Trabajo: Cátedra y Servicio de Reproducción Animal,
Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad Nacional de La Plata.**

Miembros Titulares del Jurado:

MV, BC&I, DCVet, Sandra Arauz

MV, DCVet, Adriana Massone

MV, MSc, PhD, Fernando Scenna

La Plata, 24 de febrero del 2012

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

El mayor de mis agradecimientos es para mi director de tesis, Luzbel de la Sota; por brindar su capacidad y experiencia científica sin reservas, por confiar en mí, por siempre intentar que los progresos sean con aprendizaje y por su calidez en el trato que hace sentir bien a toda persona que trabaja con él.

De igual modo, quiero agradecer muy especialmente a todos los que trabajan en la Cátedra y el Servicio de Reproducción Animal; por su compañerismo que siempre hizo más ameno los momentos, por los mates, por siempre haberme brindado una mano cuando la necesitaba y también por haberme prestado la oreja en algún que otro día gris.

A Lorena Migliorisi por los RIA, la ayuda en las traducciones, en la interpretación de las biopsias y por su buena predisposición; y a Ángel Russo por sus valiosas críticas sobre este trabajo y por su ejemplo de docencia y de continuo aprendizaje.

A los más jóvenes, hoy todos colegas, que con su empeño y buena predisposición me han ayudado a realizar el trabajo de campo: María Jaureguiberry, Juli Ploentzke, Mauro Molina, Corina Bainotti y Lucas Massola.

A los veterinarios que permitieron y ayudaron a que fuese posible la realización de los experimentos en sus lugares de trabajo: Edgardo Alvarez, Daniel Albarracin, Miguel Mejia, Roby y Martín Magnasco, Germán Dominguez, y Enrique Cadenas; y a todo el personal de los tambos que colaboró haciendo posible los muestreos.

A Marc Drillich por haberme guiado en el trabajo de histeroscopia durante mi estancia en Alemania.

A Adriana Massone y a Gabriela Giacoboni por su colaboración con los experimentos I y IV respectivamente.

A Mauricio Giuliodori por su contribución con el análisis estadístico y a Andrés Soto y a Gustavo Zuccolilli por ayudarme con las fotos de las citologías.

A la UNLP por haberme permitido realizar mis estudios de grado y postgrado

A la CIC y al CONICET por haberme becado para poder dedicarme a realizar la tesis

A los jurados por sus aportes y correcciones

A Rubén, mi marido, quien hace que con su amor y comprensión mis días estén llenos de luz.

A mamá por el apoyo incondicional de siempre y al resto de mi familia y amigos por estar, a pesar de los kilómetros.

A todos... ¡MUCHAS GRACIAS!!!

ÍNDICE

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE PUBLICACIONES	XIV
RESUMEN.....	XVI
SUMMARY	XVII
CAPITULOS	
I. INTRODUCCION GENERAL	
Introducción	01
II. COMPARACION DE LA CITOLOGIA ENDOMETRIAL CON LA BIOPSIA UTERINA PARA EL DIAGNOSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLINICA	
Introducción	07
Histología del útero bovino	07
Biopsia uterina.....	09
Cytobrush	10
Materiales y Métodos	12
Diseño experimental y animales	12
Diagnostico de endometritis clínica	13

	Cytobrush	14
	Biopsia uterina.....	20
	Análisis estadístico	21
	Resultados	22
	Discusión.....	26
	Conclusiones	28
III.	ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE CITOLOGIA ENDOMETRIAL PRESENTES DURANTE EL CICLO ESTRAL BOVINO	
	Introducción	29
	Materiales y Métodos.....	32
	Diseño experimental y animales	32
	Análisis estadístico.....	35
	Resultados	35
	Discusión.....	38
	Conclusiones	41
IV.	DETERMINACION DE LOS PUNTOS DE CORTE PARA EL DIAGNOSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLINICA POR LA TECNICA DE CYTOBRUSH Y ESTUDIO DE SU PREVALENCIA E IMPACTO SOBRE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN VACAS DE TAMBO	
	Introducción	42
	Materiales y Métodos.....	45

	Diseño experimental y animales	45
	Análisis estadístico	46
	Resultados	47
	Discusión.....	53
	Conclusiones	54
V.	DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DE LA ENDOMETRITIS SUBCLINICA	
	Introducción	56
	Materiales y Métodos	60
	Diseño experimental y animales	60
	Análisis estadístico	62
	Resultados	62
	Discusión.....	65
	Conclusiones	69
VI.	USO DE LA HISTEROSCOPIA PARA LA EVALUACION DE TECNICAS DIAGNOSTICAS DE ENDOMETRITIS CLINICA Y SUBCLINICA	
	Introducción	70
	Materiales y Métodos	72
	Diseño experimental y animales	72
	Análisis estadístico.....	76
	Resultados	76

Discusión.....	80
Conclusiones	81
Posibles aplicaciones de la histeroscopia en el futuro	82
VII. CONCLUSIONES GENERALES	84
VIII. BIBLIOGRAFÍA	87
IX. BIOGRAFÍA PERSONAL	94

“La etiología y patogenia de los problemas de fertilidad, fuera de unas pocas excepciones, no son comprendidos suficientemente. Limitaciones de las técnicas de diagnóstico y de los métodos usados dan como resultado una terapéutica basada en vagas y oscuras impresiones clínicas, antes que un razonamiento lógico”

Ray Zemjanis

LISTA DE ABREVIATURAS

BU	Biopsia Uterina
CB	Cytobrush
d	Día
dpp	Días postparto
EC	Endometritis clínica
ES	Endometritis subclínica
F0	Flujo 0
F1	Flujo 1
F2	Flujo 2
F3	Flujo 3
FL	Flujeo
HI	Histeroscopia
IA	Inseminación artificial
IP1S	Intervalo parto-primer servicio
IPC	Intervalo parto-concepción
IPP	Intervalo parto-parto
PMN	Polimorfo nucleares neutrófilos
PT	Palpación Transrectal
RP	Razón de probabilidad (OR, Odds Ratio)
TR	Tasa de riesgo (HR, Hazard Ratio)
VG	Vaginoscopia

LISTA DE TABLAS

Tabla

3.1.	Cuadrado medio mínimo y error estándar de las concentraciones de progesterona y del área, perímetro y diámetro de Feret de las células endometriales durante el ciclo estral en vacas sincronizadas con un protocolo Ovsynch	38
4.1.	Análisis de la curva ROC para estimar el porcentaje de corte de neutrófilos, el área bajo la curva, el error estándar, el 95% del intervalo de confianza y la probabilidad para los intervalos de 21-33, 34-47, 48-62 y 21-62 dpp.....	48
4.2.	Razón de probabilidad de preñez, 95% del intervalo de confianza y probabilidad del porcentaje de preñez a la primera inseminación, del porcentaje de preñez a los 100 dpp y del porcentaje de vacas vacías a los 200 dpp en vacas con ES comparado con vacas normales.	49
4.3.	Análisis de sobrevivencia y análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox del intervalo parto primer servicio y parto concepción en vacas normales y con ES.....	52
4.4.	Análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox del intervalo parto primer servicio y parto concepción.....	52
6.1.	Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, y exactitud de la palpación transrectal y la vaginoscopía comparado con la histeroscopia usada como método de oro para el diagnóstico de EC.....	79
6.2.	Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y eficiencia del cytobrush para el diagnóstico de ES	79

LISTA DE FIGURAS

Figura

2.1.	Representación esquemática de un corte histológico transversal de útero bovino.....	08
2.2.	Fotografías del instrumental utilizado en el estudio para realizar el cepillado del endometrio	17
2.3.	Fotografías de la pistola para el cepillado endometrial en un tracto reproductivo bovino	18
2.4.	Fotografía del procesamiento de la muestra de citología endometrial a campo	19
2.5.	Fotografía de la pinza de biopsia endometrial utilizada para realizar el estudio	21
2.6.	Microfotografías de cortes histológicos de biopsias uterinas	24
2.7.	Microfotografías de extendidos de citologías endometriales.....	25
3.1.	Cuadrado medio mínimo y error estándar de las concentraciones de progesterona, del porcentaje de neutrófilos y del porcentaje de leucocitos mononucleares durante el ciclo estral en vacas sin EC sincronizadas con un protocolo Ovsynch	37
4.1.	Curva ROC para estimar el porcentaje de corte de neutrófilos para el diagnóstico de ES para los intervalos de dpp: 21 a 33, 34 a 47, 48 a 62 y 21 a 62	50
4.2.	Curva de sobrevivencia del porcentaje de vacas vacías y los días de vaca vacía para los intervalos de dpp: 21 a 33, 34 a 47, 48 a 62 y 21 a 62	51
5.1	Bacterias aisladas según el diagnóstico de EC y ES.....	64

5.2.	Bacterias aerobias y anaerobias aisladas según el diagnóstico de EC y ES	64
6.1.	Fotografías del histeroscopio utilizado en el estudio.	74
6.2.	Imágenes obtenidas con el endoscopio rígido utilizado en el estudio	78

LISTA DE PUBLICACIONES

1. Madoz LV, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, Bainotti C, Giuliadori MJ, Cadenas E, de la Sota RL. Relación entre los cambios de la citología endometrial durante el ciclo estral bovino y el diagnóstico de endometritis subclínica. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba, 09 al 11 de septiembre 2011
2. Madoz LV, Ploentzke J, Albarracin D, Mejia M, Drillich M, de la Sota RL. Prevalencia de endometritis clínica y subclínica durante el postparto de vacas de tambo y su impacto sobre la eficiencia reproductiva. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba. 29 junio al 1 de julio 2007. Memorias p 306.
3. Madoz LV, Ploentzke J, Albarracin D, Mejia M, Drillich M, Heuvisser W, de la Sota RL. Prevalence of clinical and subclinical endometritis in dairy cows and the impact on reproductive performance, 2008 Reprod. Domest. Anim. 43 Supplem. 3:51.
4. Madoz LV, Ploentzke J, Dominguez GA, Jaureguiberry M, Suzuki K, de la Sota RL. Effect of subclinical endometritis on reproductive performance in dairy cows in Argentina. XXVI World Buiatrics Congress. Santiago, Chile, 14 al 18 de noviembre 2010.
5. Madoz LV, Molina M, Jaureguiberry M, Cadenas E, de la Sota RL. Estudio bacteriológico de la endometritis subclínica en vacas de tambo. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba, 09 al 11 de septiembre 2011.

6. Madoz LV, de la Sota RL, Suzuki K, Heuwieser W, Drillich M. Use of hysteroscopy to evaluate the diagnosis of endometritis in dairy cows, 2010. *Veterinary Records*, 24; 167(4):142-3.
7. Madoz LV, de la Sota RL, Suzuki K, Heuwieser W, Drillich M. Efficiency of diagnosis of clinical and subclinical endometritis in cattle evaluated by hysteroscopy. 2010 *Reprod. Fertil. Devel.* 22:251.

TITULO Endometritis subclínica en vacas de tambo: diagnóstico, prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva

PALABRAS CLAVES Vacas, endometritis subclínica, citología endometrial, puntos de corte, eficiencia reproductiva, bacteriología

RESUMEN

Esta tesis tuvo cinco objetivos principales: 1) conocer el grado de asociación entre los resultados del grado de inflamación subclínica obtenidos mediante la técnica de cytobrush (CB) y los cambios en la histología uterina mediante la evaluación de biopsias uterinas (BU); 2) estudiar las variaciones fisiológicas del porcentaje de polimorfo nucleares neutrófilos (PMN) en la citología endometrial durante el ciclo estral por medio de la técnica de CB; 3) validar la técnica de CB en nuestro país y determinar la prevalencia de ES y los niveles de corte del porcentaje PMN que se correspondan con una disminución de la eficiencia reproductiva; 4) determinar los agentes bacteriológicos involucrados en la ES; 5) demostrar que la histeroscopia (HI) puede ser usada para evaluar métodos de diagnóstico de EC y ES en vacas de tambo. Para cumplir con estos cinco objetivos se realizaron cinco experimentos. Los principales resultados obtenidos en esta tesis fueron que se validó por primera vez en nuestro país la técnica del CB para realizar el diagnóstico de ES, y se determinaron los puntos de corte del porcentaje de PMN para diagnosticar a campo la prevalencia de ES. Durante el ciclo estral, el porcentaje de PMN nunca superó el 2% de PMN, mientras que con porcentajes de PMN superiores al 8%, 6%, 4% y 5% a los 21-33, 34 a 47, 48 a 62 y 21 a 62 dpp se comienza a observar una disminución de la eficiencia reproductiva. Este ha sido el primer trabajo en nuestro país en demostrar que las vacas con ES tuvieron 16,2% de reducción en la tasa de concepción al primer servicio, 16,8% de reducción en la cantidad de vacas preñadas a los 100 días de lactancia y 29 días de aumento de días abiertos comparado con vacas sin ES. Otro hallazgo importante de este trabajo fue que no existe relación entre ES y aislamiento bacteriano. Por último, se demostró que la HI es una técnica eficiente para el diagnóstico de EC pero ineficiente para el diagnóstico de ES.

TITLE Subclinical endometritis in dairy cows: diagnosis, prevalence and impact on reproductive performance

KEY WORDS Cows, subclinical endometritis, endometrial cytology, thresholds, reproductive performance, bacteriology.

SUMMARY

The primary objectives of this dissertation were: 1) to compare the association between results from the uterine cytobrush with the uterine biopsy; 2) to study the polymorphonuclear neutrophils (PMN) physiological variations during the estrous cycle with the cytobrush; 3) to validate the cytobrush technique and estimate prevalence of subclinical endometritis and PMN thresholds that are related to reduced reproductive performance of dairy cows; 4) to study the bacteria associated with subclinical endometritis; and 5) to demonstrate that hysteroscopy can be used to diagnose clinical and subclinical endometritis in dairy cows. Five experiments were carried out to accomplish these objectives. The most relevant results from this dissertation were the validation of the cytobrush technique to diagnose subclinical endometritis and PMN thresholds derived from reduced reproductive performance. Furthermore, during the estrous cycle, the PMN counts never were above 2% while PMN counts above the thresholds of 85, 6%, 4% and 5% at 21-33, 34-47, 48-62 and 21-62 dpp were associated with a decrease in reproductive performance. In fact, this is the first study to report in Argentina that dairy cows with subclinical endometritis had a 16,2 % reduction in conception rate to first service, 16,8% less pregnant cows by 100 dpp, and an increase of 29 days open compared to normal cows. Other important findings from this work were that there was no relationship between subclinical endometritis and bacterial isolations, and that hysteroscopy proved to be efficient for diagnosis of clinical endometritis but not efficient for diagnosis of subclinical endometritis.

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL

El objetivo del manejo reproductivo del tambo es lograr que las vacas se preñen en manera eficiente en un intervalo rentable luego del parto (Dijkhuizen y col., 1985). Las intervenciones veterinarias y de manejo sólo son beneficiosas si se logra preñar las vacas en un tiempo óptimo posparto. (LeBlanc y col., 2002).

Para que los exámenes reproductivos antes del período de servicio posparto sean eficientes, estos deben identificar aquellas vacas que presenten alto riesgo de fallar en quedar preñadas en un tiempo oportuno. Es importante tener en cuenta, que los rechazos por causas reproductivas son uno de los principales motivos de descarte en los tambos, y los rechazos por infertilidad la principal causa de rechazos reproductivos.

Las vacas de tambo se enfrentan a un gran desafío durante el postparto, dado que es una etapa de máximos requerimientos. Además del aumento progresivo de la producción láctea hacia el pico de lactancia, se suman la involución uterina, el retorno a la ciclicidad y el establecimiento de una nueva gestación. El diagnóstico correcto y temprano de ciertas patologías uterinas que pueden llegar a presentarse y complicar este intrincado mecanismo es de suma importancia, permitiendo actuar a tiempo y mantener la eficiencia reproductiva del rodeo.

En numerosos estudios realizados durante los últimos 30 años, los términos metritis y endometritis han sido utilizados en forma indistinta sin tener a menudo una clara definición del caso clínico (Bargo y col., 2009; Corbellini y col., 2008; Correa y

col., 1993; Erb y col., 1984; Erb y col., 1985; Gröhn y col., 1990). Esta falta de uniformidad de términos dificultaba la interpretación de distintos informes, por lo que se generó la necesidad de unificar criterios prácticos de los casos clínicos que permitan identificar vacas con eficiencia reproductiva disminuida (LeBlanc y col., 2002). Posteriormente, esto quedó solucionado con una actualización de las definiciones clínicas de los trastornos uterinos en el postparto bovino (Sheldon y col., 2006).

Tanto las metritis como las endometritis, son inflamaciones del útero; las metritis se presentan antes de la finalización del puerperio clínico (21 dpp) y afectan no sólo al endometrio sino a todas las capas que forman la pared uterina. A su vez, las metritis se clasifican en puerperal y clínica variando entre ellas la sintomatología y la gravedad del pronóstico de la hembra afectada. Por otro lado, en el caso de las endometritis, sólo el endometrio es afectado y se presentan a partir de los 21 dpp. Las endometritis se clasifican en clínicas y subclínicas; sólo en el primer caso el animal muestra signos de alteraciones uterinas y según éstas se la divide en tres grados según las características que presenta el flujo uterino (F1, F2 y F3) que varía desde mucoso levemente purulento a francamente purulento con olor desagradable (Dominguez y col., 2006; Sheldon y col., 2006). Dentro de las afecciones del postparto de las vacas lecheras, las endometritis ocupan un papel preponderante.

A diferencia de la EC, en la ES sólo se detecta la presencia de PMN en la luz uterina sin estar acompañada de descargas uterinas (Sheldon y col., 2002). Debido a que la ES se presenta en vacas clínicamente sanas, es decir animales con flujo vaginal normal y sin signos clínicos sistémicos evidentes, no es normalmente diagnosticada. Por lo tanto, aquellas vacas que no muestran ningún indicio de trastorno reproductivo pueden igualmente estar padeciendo de ES, y como consecuencia de esto, no sea la

óptima la fertilidad que pueda ser lograda de esa hembra al finalizar el período de espera voluntario.

Está comprobado, que bajo cualquier sistema de producción, la EC y la ES afectan la eficiencia reproductiva de las hembras al aumentar los intervalos IP1S, IPC e IPP así como también, la cantidad de servicios necesarios por preñez (Bondurant, 1999; Gilbert y col., 2005; Kasimanickam y col., 2004; Madoz y col., 2008; Magnasco y col., 2007).

Los PMN son la primera barrera de defensa ante la invasión bacteriana. Estas células con capacidad fagocítica, son reclutadas desde la circulación periférica hacia la luz uterina para fagocitar a las bacterias tratando así de controlar la invasión bacteriana. Sin embargo, la capacidad funcional de los PMN se encuentra reducida en el postparto de muchas hembras. Esta disminución puede favorecer y predisponer al establecimiento de afecciones uterinas tanto clínicas como subclínicas (Sheldon and Dobson, 2004). La inflamación subclínica del endometrio necesita, para poder ser diagnosticada, de algún método complementario como el análisis citológico, ya que como se comentó, el animal no presenta ningún signo local o general que oriente a pensar en la existencia de una patología uterina (Sheldon y col., 2006).

La citología endometrial es una práctica que recientemente se ha comenzado a utilizar para la evaluación de la salud uterina en bovinos (Gilbert y col., 1998; Palmer, 2006). Se caracteriza por ser rápida, específica, sensible y económica, lo que la hace una herramienta valiosa para la investigación sobre el rol y la importancia de la endometritis (Gilbert, 2005).

Las muestras para citología pueden ser tomadas principalmente por medio de dos técnicas: lavaje uterino (Gilbert y col., 1998; Gilbert y col., 2005) y CB

(Kasimanickam y col., 2004, 2005; Lenz y col., 2007). También se han citado, como posibles técnicas para el diagnóstico de ES aunque de menor uso, a la biopsia (Bonnet y col., 1991), al hisopado (Studer and Morrow, 1978b) y a la ultrasonografía (Barlund y col., 2008; Kasimanickam y col., 2004). En todos los casos las muestras se obtienen de animales que fueron previamente diagnosticados como negativos a EC.

El lavaje uterino se basa en la infusión de una pequeña cantidad de solución fisiológica dentro de la cavidad uterina, masajeo uterino, recuperación, centrifugado y evaluación microscópica de la muestra (Palmer, 2006). Presenta como desventaja la falta de practicidad, y la tendencia a la generación de irritaciones uterinas y a la alteración celular de las muestras. Por el contrario, la técnica de CB se basa en la obtención de células a partir del endometrio, mediante un cepillado de la superficie interna del útero. La técnica es confiable y no genera alteración celular como si sucede con el lavaje uterino (Kasimanickam y col., 2005).

En la evaluación de las muestras se determina el porcentaje de PMN sobre células totales. Este porcentaje es indicativo de la presencia o no de inflamación subclínica en el endometrio, y se encuentra correlacionado negativamente con los días en lactancia del animal, por lo tanto hay una disminución en el número de PMN a medida que se aproxima la completa reparación histológica del útero (Kasimanickam y col., 2005).

Según estudios realizados en Argentina (Capitaine Funes, 2005), se ha demostrado que en los tambos, la preñez a la primera IA postparto, en promedio, no supera el 35%. A su vez, otros estudios, (Dominguez y col., 2006; Domínguez y col., 2003) mostraron que las vacas que padecieron algún grado de endometritis luego tuvieron una disminución de la fertilidad que varió entre el 15% y el 26%, comparado

con las vacas que no padecieron endometritis durante el postparto. Todo esto indica, que el límite para mejorar la eficiencia reproductiva no radica en el mejoramiento de las biotecnologías aplicadas a la reproducción, como son los protocolos de sincronización de dinámica folicular y luteal, sino que radica primordialmente en mejorar el medio ambiente uterino donde se desarrollará la potencial gestación.

Si bien se han realizado tres estudios preliminares sobre la prevalencia de ES en tambos comerciales de nuestro país; estos trabajos se realizaron utilizando valores de corte arbitrarios 10% (Feresin y col., 2006) y 5% (Plontzke y col., 2010), o valores de corte del 10% y el 18% obtenidos con análisis de curva ROC de trabajos realizados en otros países como Canadá (Madoz y col., 2008). De lo expuesto anteriormente sería necesario realizar un estudio sobre: 1) la prevalencia de ES, en el cual mediante la utilización del análisis de curvas ROC se pueda relacionar el efecto de un aumento del porcentaje de PMN sobre la eficiencia reproductiva de vacas de tambos comerciales. 2) Analizar la variación del porcentaje de PMN a lo largo del ciclo estral para determinar si existen variaciones a lo largo del mismo, en relación con las concentraciones de P4. 3) Comparar los resultados de la citología uterina obtenidos con la técnica del CB con un método de referencia como la BU. 4) Efectuar un estudio de los aislamientos bacterianos de casos de ES positivos, para poder luego seleccionar tratamientos con antibióticos acorde con las flora causante del caso subclínico. 5) Comparar la sensibilidad y especificidad de las diversas técnicas de diagnóstico a campo de EC y ES, con el fin de llegar a conocer la eficiencia real de cada una de ellas, para diagnosticar casos clínicos o subclínicos.

En virtud de lo anteriormente expuesto, los cinco objetivos de esta tesis fueron: 1) conocer el grado de asociación entre los grados de inflamación subclínica obtenidos mediante la técnica del CB y los cambios en la histología uterina mediante la evaluación de BU; 2) estudiar las variaciones fisiológicas del porcentaje de PMN en el endometrio durante el ciclo estral por medio de la técnica de CB; 3) validar la técnica de CB en nuestro país y determinar los niveles de corte que se correspondan con una disminución de la eficiencia reproductiva; 4) determinar los agentes bacteriológicos involucrados en la ES; y 5) demostrar que la HI puede ser usada para evaluar métodos de diagnóstico de EC y ES en vacas de tambo. Para cumplir con estos cinco objetivos se realizaron cinco experimentos que se describen en los capítulos siguientes.

CAPITULO II

COMPARACION DE LA CITOLOGIA ENDOMETRIAL CON LA BIOPSIA UTERINA PARA EL DIAGNOSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLINICA

INTRODUCCION

Histología del útero bovino

La pared uterina consta de tres capas al corte transversal, la mucosa-submucosa o endometrio, la muscular o miometrio y la serosa o perimetrio. El endometrio está formado por dos capas, una superficial y otra profunda. La capa superficial posee un epitelio cilíndrico simple y/o cilíndrico pseudoestratificado, pudiendo llegar a ser cúbico en zonas aisladas, estas células de revestimiento se continúan con el epitelio de las glándulas uterinas. Las glándulas son de tipo tubular, se abren en la superficie de la mucosa uterina y se extienden en el espesor del estroma endometrial, terminando en extremos ciegos. Por debajo del epitelio se encuentra la lámina propia o corion formada por tejido conjuntivo laxo altamente vascularizado con fibroblastos, macrófagos y mastocitos. Hacia la profundidad de la capa superficial el tejido conjuntivo se va haciendo menos celular.

Las carúnculas son engrosamientos circunscriptos del endometrio libres de glándulas, que se ubican en cuatro hileras por cuerno de aproximadamente quince carúnculas cada una, y son en forma de cúpula en el caso de la vaca (Dellmann and Brown, 1993).

El miometrio está compuesto por haces de fibras musculares lisas separadas por

tejido conectivo. Se describen tres capas, un estrato circular interno de fibras musculares, un estrato vascular de tejido conectivo rico en vasos sanguíneos y un estrato externo de músculo longitudinal. Los vasos ubicados en la capa vascular, irrigan el endometrio y son particularmente grandes en las cercanías a las regiones carunculares (Claver y col., 1987; Dellmann and Brown, 1993; Hansel, 1959).

La capa más externa del útero es la serosa o perimetrio, compuesta por una capa fina de tejido conjuntivo laxo, algunas fibras musculares lisas y un epitelio plano mesotelial el cual se continúa con el mesotelio peritoneal. A su vez, el perimetrio se continúa hacia los lados con los ligamentos anchos uterinos (Claver y col., 1987). En la Figura 2.1 se muestra una representación esquemática de un corte histológico transversal de útero bovino (Adaptado de (Constantin and Meissonnier, 1981).

Figura 2.1. Representación esquemática de un corte histológico transversal de útero bovino (Adaptado de Constantin and Meissonnier, 1981).

Biopsia uterina

Las BU fueron inicialmente utilizadas en 1960 como herramienta de investigación de infertilidad en yeguas (Chapwanya y col., 2010). La técnica permite la obtención de una muestra de la mucosa del útero para el examen histopatológico y ha sido utilizada principalmente en reproducción equina debido a que mediante ésta, se logra pronosticar la habilidad de la yegua para concebir y para llevar a término una nueva gestación (Kenney, 1978). Así como en la hembra equina, en la bovina, la BU también permite obtener mayor información acerca del estado del útero, para así poder así decidir mejor acerca del futuro reproductivo de la hembra (Perusia y col., 1998) (Campero y col., 1992). Si bien se han establecido diversos grados de clasificación histológica de las biopsias, aún no se han determinado claramente los criterios predictores de aptitud reproductiva (Buergelt, 1997; Trigo Tavera, 1998). Por expuesto, sumado a la dificultad de la técnica y al entrenamiento que requiere el muestreo e interpretación de las biopsias, su uso en los bovinos se encuentra generalmente limitado a la investigación, con el fin de relacionar diagnósticos logrados por otros métodos con los cambios uterinos a nivel estructural (Chapwanya y col., 2010).

En varios estudios en los que se evaluaron BU tomadas de diferentes regiones del útero, se encontró una alta correlación general, en la que la clasificación inflamatoria de una biopsia de un cuerno, podía ser considerada como representativa de la situación del cuerno opuesto (Studer and Morrow, 1978a) (Cobb and Watson, 1995). Similares resultados se encontraron tras un estudio hecho con úteros provenientes de matadero, el que reveló una buena correlación de hallazgos entre secciones de los dos cuernos y del cuerpo del útero. La calificación inflamatoria de los dos cuernos resultó ser de alta concordancia ($P < 0.01$), indicando que una muestra del cuerpo del útero

refleja la totalidad del endometrio (Studer and Morrow, 1980).

Cytobrush

La técnica de CB se basa en la obtención de células a partir del endometrio, mediante un cepillado de la superficie interna del útero. El CB ha demostrado ser la mejor técnica para la obtención de citologías uterinas en vacas para el diagnóstico de ES (Kasimanickam y col., 2005).

Para la obtención de las muestras, se utilizan pistoletas de acero inoxidable, a las que se le adosan en su extremo anterior cepillos estériles comúnmente usados en ginecología humana. Todo esto es protegido mediante una vaina sanitaria plástica, para evitar la contaminación del cepillo con células del cuello y de la vagina. Si bien la técnica del CB ha demostrado ser consistente y eficaz para obtener muestras de las células del endometrio y realizar el examen citológico postparto en vacas lecheras (Kasimanickam y col., 2005; Raab y col., 2003), la técnica original requiere utilizar una pistola estéril para realizar la muestra de cada vaca, lo que hace la técnica muy poco práctica para su uso fuera del ámbito científico. Por lo tanto, el desarrollo de una técnica que requiera equipamiento más simple y que sea de rápida realización a campo, tal vez permitiría extender el uso del CB a varios usos diagnósticos bajo condiciones de explotación comercial como pueden ser pre IA, pre transferencia embrionaria, diagnóstico de vacas repetidoras, etc.

Idealmente, una nueva técnica de diagnóstico debe ser evaluada con una técnica que ya existe o “método de oro” que sin ambigüedades defina el grado del trastorno. Un método de oro es una prueba o procedimiento absolutamente preciso en su diagnóstico. En la práctica, solo existen pocos verdaderos métodos de oro; esto es debido

parcialmente a imperfecciones propias de los test y a variaciones biológicas; ejemplos de estas variaciones podrían ser los períodos de incubación de las enfermedades que se diagnostican, o el pasaje de una enfermedad clínica a una subclínica (Dohoo y col., 2003)

En el caso de los trastornos uterinos, no existe tal método, aunque se ha postulado que en el caso de las endometritis, el diagnóstico definitivo debería ser hecho en base al examen histológico de las biopsias endometriales (Sheldon y col., 2006). Por lo que precede, considero que la técnica de CB debe ser validada a través de su comparación con la biopsia endometrial.

Existen informes que indican para la EC, una mayor correlación entre los hallazgos clínicos e histopatológicos que los observados entre la clínica y los aislamientos bacteriológicos. Como ejemplo se podría nombrar la presencia de fibrosis periglandular, la cual permite emitir un pronóstico desfavorable, pese a que los resultados bacteriológicos hayan sido negativos. (Campero y col., 1992).

En el caso del diagnóstico de ES, la correlación entre la clínica, la bacteriología y las alteraciones histopatológicas no es sencilla. En parte porque los animales con ES no manifiestan ningún signo de trastorno local ni sistémico, y además debido a que no existe evidencia de asociación bacteriológica con la misma. La disminución de los índices reproductivos son la única manifestación externa de la ES, por lo que mediante la medición de dichos índices, se debería también evaluar la técnica, para luego poder correlacionarlo con los hallazgos citológicos e histopatológicos logrados a través del CB y de la biopsia endometrial.

En resumen, la BU es una herramienta muy útil para determinar el futuro reproductivo en las yeguas. En la especie bovina, no se usa de rutina y no existe una clasificación de criterios que permita predecir la aptitud reproductiva de la hembra. De todas formas, la evaluación de biopsias uterinas provee mucha información, y permite correlacionar diagnósticos logrados por otros métodos con los cambios uterinos a nivel estructural. Por otro lado, la técnica de CB permite lograr una muestra rápida y con morfología celular preservada para el diagnóstico de inflamación subclínica del endometrio. El objetivo general de este capítulo fue validar el uso de la técnica de CB para el diagnóstico de ES.

El objetivo de este capítulo fue conocer si el grado de inflamación subclínica diagnosticada por la técnica del CB está correlacionado con cambios en la histología uterina mediante la evaluación de BU.

La hipótesis principal fue que los cambios inflamatorios detectados por el CB se corresponderían con cambios histológicos endometriales observados con la BU.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental y animales

Para la realización de este estudio se utilizaron hembras bovinas (*Bos taurus*) de raza Holando Argentino pertenecientes al tambo Santa Catalina de la Universidad Nacional de La Plata, que se encuentra ubicado en la localidad de Lavallol, partido de Lomas de Zamora, en la provincia de Buenos Aires.

Los animales utilizados (n=44) se encontraban bajo sistema pastoril de producción láctea. Las hembras eran uníparas o pluríparas y se encontraban entre 31 y 59 dpp al momento del muestreo. Para ser incluidos en el estudio los animales no debían haber presentado distocia, aborto, retención de membranas fetales ni tratamientos intrauterinos en o posterior a su último parto.

Previo a la toma de muestras se realizaba la evaluación general de cada vaca a muestrear. La misma consistía en la medición de la CC, la evaluación externa e interna del aparato reproductivo con el correspondiente diagnóstico de EC. A través de la inspección general y palpación se determinaba la CC, la cual era medida en la escala de 0 a 5 (Edmonson y col., 1989), criterio de inclusión $CC \geq 2.5$. Posteriormente se inspeccionaba el área perineal, la cola y los tarsos en busca de descargas frescas o secas. Luego se realizaba la PT con el fin de determinar la morfología del útero y la presencia de estructuras palpables en los ovarios (Zemjanis, 1973).

Diagnóstico de EC

El diagnóstico de EC se realizó por medio de la recuperación de flujo vaginal conocida como FL. Para el mismo, una vez que el animal era contenido e inmovilizado en el cepo, la zona perineal era higienizada con abundante cantidad de agua y secada con toallas descartables de papel. La mano contraria a la usada para el tacto era protegida con un guante de látex, los labios de la vulva eran abiertos con los dedos de esta mano mientras que la otra, cubierta por un segundo guante de tacto nuevo y lubricado con gel de ultrasonido, era ingresada a la vagina. Luego se palpaban las paredes laterales y la pared craneal de la vagina; el cérvix era palpado con el fin de determinar su grado de abertura, forma y posibles lesiones que pudieran existir. El flujo

vaginal era colectado en la mano en la parte más craneal de la vagina. La mano, una vez retirada de la vagina, era abierta a contraluz para permitir la evaluación del mucus (Dominguez y col., 2006; Sheldon y col., 2006).

El flujo vaginal colectado era clasificado en cuatro grados según sus características: flujo normal translúcido sin flóculos de pus (F0), flujo con flóculos de pus (F1), flujo purulento sin olor (F2), y flujo purulento con olor fétido (F3). Aquellos animales que presentaban F0 eran diagnosticados negativos a EC y aquellos que presentaban F1, F2 o F3 eran diagnosticados con EC. (Dominguez y col., 2006; Sheldon y col., 2006). Luego se procedía a la toma de una muestra de CB y de una BU por animal.

Cytobrush

Para poder realizar este estudio se desarrolló un nuevo modelo de pistola de acero inoxidable que permite utilizar cepillos ginecológicos cérvico-uterinos descartables (Papanicolaou) y vainas sanitarias descartables tipo Cassou de IA. Esta modificación permite utilizar una sola pistola para realizar el muestreo de varias vacas con solo realizar el cambio de los cepillos y vainas descartables entre cada muestra. Además, permite realizar la toma de muestras en un tiempo mucho más corto y a menor costo, debido a que ambos descartables se fabrican en el país.

Brevemente, la pistola desarrollada consta básicamente de cinco partes (Figura 2.2)

- A. Pieza tubular de acero inoxidable hueco en todo su largo de 43,5 cm de longitud, con la parte posterior ranurada y terminada en forma de cono; con un tope interno de 5 cm en la parte anterior de la pieza.

- B. Pieza tipo émbolo alargada de acero inoxidable de 45,5 cm de longitud, con 1 cm de rosca en la parte anterior, y con un disco terminal a modo de tope posterior de la pieza.
- C. Cepillo de cerdas plásticas suaves insertas en un eje de alambre de 2 cm de longitud, cabo plástico de 5 cm de largo. Son de uso común en ginecología humana y se adquieren estériles (Medibrush, Argentina).
- D. Anillo plástico.
- E. Vaina plástica transparente de IA de 43,8 cm de largo y 0,5 cm de diámetro (IMV, Francia).

Las porciones C y E son descartables y ambas son ampliamente comercializadas para otros usos en medicina humana y veterinaria, lo que permite el recambio entre animales, previniendo la contaminación de la muestra y la transmisión de enfermedades de una animal a otro.

Una vez fijado el cérvix vía rectal, se procedía al cateterismo del mismo, mediante una maniobra similar a la utilizada en la IA. Una vez alcanzado el cuerpo uterino la pistola era dirigida a un cuerno, en ese momento el cepillo era expuesto a la superficie endometrial de un cuerno uterino y girado dos vueltas completas en sentido horario; luego el cepillo era retraído dentro de la vaina sanitaria (Figura 2.3).

Una vez tomada la muestra, el cepillo era desmontado de la pistola, rotado sobre un portaobjetos nuevo, numerado y fijado para la preservación de la morfología celular. Para esto se utilizó un spray fijador comercial de cabello en aerosol (Roby, Argentina) el cual era rociado finamente sobre el portaobjetos (Figura 2.4).

Una vez en el laboratorio, las muestras eran coloreadas con tinción comercial diferencial rápida tipo Giemsa modificada, Tinción 15 (Biopur, Argentina). La

evaluación de las muestras se hizo con microscopio óptico a 400 aumentos (Nikon Eclipse E200, Japón); para esto se contaban y diferenciaban 200 células como mínimo por preparado para así obtener el porcentaje de PMN sobre células totales (Kasimanickam y col., 2004) (Figura 2.4).

Los puntos de corte utilizados como indicativo de la presencia o no de inflamación subclínica en el endometrio (muestra positiva o negativa a ES) fueron $\geq 8\%$ PMN para el INT1 (21-33dpp), $\geq 6\%$ PMN para el INT2 (34-47dpp) y como $\geq 4\%$ para el INT3 (48-62dpp) (Madoz y col., 2010) (Capítulo III).

Figura 2.2. Fotografías del instrumental utilizado en el estudio para realizar el cepillado del endometrio. A) pistola armada y por debajo, las partes que la forman. B) porción anterior de la pistola, donde se observa el cepillo y la vaina que lo recubre.

Figura 2.3. Fotografías de la pistola para realizar el cepillado del endometrio en un tracto reproductivo bovino. A) pistola localizada en la curvatura menor del cuerno uterino derecho sin exteriorizar el citocepillo de la vaina. B) porción anterior de la pistola con el citocepillo exteriorizado listo para realizar la toma de muestra de citología endometrial.

Figura 2.4. Fotografías del procesamiento de la muestra de citología endometrial a campo. A) corte de la vaina para exteriorizar el citocepillo (Medibrush, Argentina); B) extendido sobre el portaobjetos; C) fijado del extendido con spray; D) coloración del extendido con tinción 15 (Biopur, Argentina).

Biopsia uterina

Para su obtención, se utilizó una pinza de biopsia de acero inoxidable de 53 cm de largo total y 0,5 cm de diámetro anterior, en cuyo extremo poseía una pequeña mandíbula de 0,6 x 0,4 cm con filo en los bordes de corte. El mecanismo de corte era manejado a través del cierre de su parte posterior, tipo tijera (Figura 2.5). Previo a cada uso, la pinza era desinfectada (Bagodryl, Biogénesis Bagó) para evitar contaminaciones entre los animales.

La toma de muestras se realizaba una vez enhebrado el cérvix, con el extremo anterior de la pinza posicionado sobre la superficie endometrial de un cuerno uterino (misma técnica que la explicada para el CB). Luego se abrían las ramas de la pinza y haciendo leve presión sobre el útero desde el recto, se cerraban las ramas y se giraba la pinza 90 grados. Una vez que la pinza de BU era retirada del animal, la porción biopsiada era tomada con una pinza de mano tipo anatómica y colocada en tubos con tapa tipo Eppendorf (1,5 ml) con solución formolada tamponada al 10% hasta su procesamiento histológico. Posteriormente en el laboratorio, las muestras eran deshidratadas, incluidas en parafina, cortadas con micrótopo y teñidas con hematoxilina y eosina para la obtención de los cortes correspondientes de útero. El procesamiento de las biopsias fue realizado por un técnico histólogo.

Las biopsias fueron observadas y clasificadas a ciegas por dos operarios. Para la clasificación de las mismas se utilizó una escala de 0 a 3 según el grado de inflamación que presentaban (Bonnett y col., 1991b) (Chapwanya y col., 2009).

- Grado 0: útero inerte o quiescente, sin inflamación
- Grado 1: Inflamación leve.
- Grado 2: Moderada inflamación.

- Grado 3: Severa inflamación.

Esta clasificación concuerda con los cambios inflamatorios de la escala utilizada por Azawi y col para las biopsias uterinas de búfalas (Azawi y col., 2008)

Figura 2.5. Fotografía de la pinza de biopsia endometrial utilizada para realizar el estudio

Análisis Estadístico

Para evaluar la correlación entre la clasificación de las biopsias realizada por los dos operarios se utilizó el índice Kappa, mediante el cual se logra cuantificar el grado de acuerdo entre los resultados de ambos. El coeficiente varía entre 0 (nulo) y 1 (máximo);

cuando el coeficiente Kappa es alto ($\geq 0,7$) indica un gran nivel de concordancia (SAS, 2009)

Los resultados de las citologías (positiva/negativa) y de las biopsias (0, 1, 2 y 3) fueron analizados por GENMOD de SAS para distribución multinomial, enlace cumulative logit. La modelización se realizó para la probabilidad de obtener biopsia 0 en función de la citología negativa vs positiva y viceversa. El grado de asociación entre las citologías y las biopsias se midió por el PROC FREQ de SAS (coeficiente Cramer's V).

RESULTADOS

Luego de haber descartado aquellas biopsias que no permitían la evaluación íntegra del corte de endometrio, y aquellas que fueron obtenidas de sitios carunculares, el análisis estadístico se realizó sobre un total de 37 animales muestreados. En la Figura 2.6 se puede observar tres microfotografías de cortes histológicos de biopsias de útero y en la Figura 2.7 se puede observar tres microfotografías de extendidos de citología endometrial realizados con la técnica de CB.

Cada uno de los evaluadores clasificó las biopsias en una escala de 0-3, y dichos resultados fueron comparados para lograr el mencionado índice de concordancia. El índice Kappa obtenido mediante la comparación de los resultados fue de 0,89, indicando una alta concordancia entre los dos evaluadores de las biopsias.

Del total de las muestras, las citologías y las biopsias tomadas de vacas con F0 (n=31) fueron analizadas en conjunto para determinar la correlación existente entre el diagnóstico citológico y el histopatológico de cada hembra estudiada. Para esto se calculó la RP, esta es la proporción entre la probabilidad de que un evento ocurra y la

probabilidad de que no ocurra (Thrusfield, 2007), y para expresarla en porcentaje se debe expresar como $RP/1+RP$.

Se encontró que existe una RP 13,1 mayor de que una citología negativa a ES se acompañe de una biopsia 0 (sin inflamación), a que lo haga una citología positiva a ES. Expresado de otra manera, hay un 92,9% de probabilidad de que una citología negativa a ES se acompañe de una biopsia de grado 0, mientras que sólo hay 0,07% de probabilidad de que una citología positiva a ES se acompañe con una biopsia de tipo 0 (RP 0,076).

Por otro lado, se encontró que sólo hay 0,07% de probabilidad de que una citología negativa a ES pueda ir acompañada de una biopsia de grado 2 (RP 0,076). En este caso, el cálculo de probabilidad de la aparición en conjunto de una citología negativa a ES con una biopsia tipo 3 no fue posible, ya que dicho tipo de biopsia no se presentó en animales con F0.

Las vacas con ES (n=4) presentaron biopsias de tipo 1 (3/4) y de tipo 2 (1/4), por lo que ninguna de ellas presentó grado nulo de inflamación.

Para medir el grado de asociación (la intensidad de relación entre dos variables nominales) entre las citologías y las biopsias, se calculó el coeficiente de contingencia de Cramer's V. El mismo es posible de ser calculado aún con diferente cantidad de columnas y de filas de la tabla de contingencia analizada. Se encontró un nivel débil de asociación entre las biopsias y las citologías, Cramer's V 0,37 (1=asociación perfecta, 0,3-0,7 asociación débil).

Figura 2.6. Microfotografías de cortes histológicos de biopsias uterinas. A) inflamación leve, edema moderado, epitelio intacto, biopsia tipo 1. B) glándulas endometriales normales, sin presencia de fibrosis, inflamación leve, biopsia tipo 1. C) atrofia glandular, inflamación moderada, biopsia tipo 2.

Figura 2.7. Microfotografías de extendidos de citologías endometriales. A) 50% PMN; B) 11% PMN; C) 0% PMN.

DISCUSION

Se encontró alta correlación ($Kappa > 0.7$) entre las clasificaciones de las biopsias por los dos operarios ($Kappa = 0.89$), aunque no así entre los hallazgos citológicos y los histopatológicos (Coeficiente Cramer's $V = 0.37$, asociación débil). Esto último podría estar dado por los cambios fisiológicos típicos del ciclo uterino bovino, los cuales podrían no verse reflejados en la citología, ya que la misma sólo muestra los tipos celulares que se encuentran en la parte más superficial del endometrio, mientras que la biopsia muestra además los que se encuentran en las capas subyacentes. Por lo tanto, estos resultados están en contraposición con nuestra hipótesis original de que los cambios inflamatorios detectados por el CB, se corresponderían con cambios histológicos endometriales observados con la BU.

La cantidad de células inflamatorias dentro de la sección podría estar relacionada con la etapa del ciclo estral en que se encontraba la hembra al momento de la toma de muestra. Estudios realizados en vacas sin problemas reproductivos, mostraron que una variada cantidad de PMN se encontraba presentes durante un tiempo relativamente corto previo y posterior al estro, mientras que en otros momentos del ciclo no se encontraban presentes. Los PMN pueden ser fisiológicamente normales en y bajo la superficie del epitelio, alrededor de los ductos glandulares y separados en el estroma superficial aun en importantes cantidades, aunque no así durante la fase luteal. Los eosinófilos en el estroma, independientemente de la fase del ciclo, podrían ser también considerados como fisiológicos, aunque nunca en grandes cantidades durante la fase luteal (Studer and Morrow, 1978a).

A pesar de que no se encontró fuerte asociación entre la totalidad de las citologías y las biopsias, los datos muestran que es alta la probabilidad (92.9%) de que una citología negativa se acompañe con una biopsia 0 (sin inflamación aparente), mientras que para el mismo caso, una citología positiva presenta una probabilidad ínfima comparativamente (0,07%). De manera inversa, se encontró también muy baja probabilidad (0,07%) de que una citología negativa a ES se pueda acompañar de una biopsia con alto grado de inflamación (biopsia tipo 2). Estos datos indicarían que a pesar de que no se encontró una alta correlación general, existe una fuerte tendencia a que las citologías negativas se acompañen de biopsias con bajo grado de inflamación, mientras que las positivas con biopsias de alto de inflamación.

Debido a que la población de vacas estudiada era heterogénea (distinta cantidad de partos), ciertos hallazgos crónicos de la evaluación histológica de las biopsias no han podido ser analizados y usados para la determinación final del grado de inflamación de la biopsia. Como ejemplo de esto podemos nombrar la presencia de fibrosis perivascular y periglandular. De la misma manera, hallazgos que varían con la etapa del ciclo estral, como el edema endometrial y la presencia de hemorragia subepitelial, fueron documentados pero no tomados en cuenta para la clasificación final, ya que la comparación de estos hallazgos podría generar una interpretación errónea. De todas formas, existen estudios donde estos hallazgos han sido utilizados junto con el grado de infiltración celular para determinar las categorías de clasificación (Chapwanya y col., 2009).

Como se ha dicho anteriormente, se ha descrito que en la vaca no existe buena correlación entre la evaluación de lesiones uterinas mediante una BU y la futura fertilidad de la hembra, como si sucede en la yegua (Trigo Tavera, 1998). De manera

contraria, en la vaca el diagnóstico de ES mediante la evaluación de citologías endometriales, ha demostrado estar relacionada con el IPP, IPC y la cantidad de servicios por preñez; o sea con la fertilidad potencial de esa reproductora (Kasimanickam y col., 2004).

CONCLUSIONES

No se encontró clara asociación entre los hallazgos histopatológicos y el diagnóstico citológico de inflamación uterina, probablemente debido a que en la vaca no se encuentran relacionados las lesiones y hallazgos uterinos con la fertilidad potencial de la hembra para llevar a cabo una nueva gestación.

CAPITULO III

ESTUDIO DE LOS CAMBIOS DE CITOLOGIA ENDOMETRIAL DURANTE EL CICLO ESTRAL BOVINO

INTRODUCCION

La citología endometrial obtenida por la técnica de CB ha demostrado ser la mejor técnica de muestreo para el diagnóstico de ES (Barlund y col., 2008; Kasimanickam y col., 2005). Esta técnica es confiable y no genera distorsión celular como sucede con el lavaje uterino (Kasimanickam y col., 2005). Además, como se ha explicado en el Capítulo II, es de fácil aplicación, utiliza material descartable y no requiere de equipamiento costoso.

En un corte histológico del útero bovino se pueden distinguir el endometrio, miometrio y perimetrio. Estas tres capas principales han sido explicadas en detalle en el Capítulo II. El endometrio, es la capa más interna y es la afectada en los casos de endometritis, presenta en vaquillonas jóvenes poco espesor y poco contenido de glándulas. Estas características cambian una vez que la hembra alcanza la madurez sexual, ya que el endometrio aumenta su espesor y la cantidad de glándulas se hace más numerosa (Hansel, 1959). A partir del momento en que la hembra comienza a ciclar, el útero bovino normal presenta, de manera similar a lo que sucede en otras especies, cambios estructurales fisiológicos que dependen del perfil hormonal predominante (Ohtani y col., 1993). Dentro de ellos, los cambios más relevantes de cada fase del ciclo estral bovino de detallan a continuación.

Al comienzo del proestro el epitelio superficial es cúbico; luego con el aumento del flujo sanguíneo aumenta el grosor del endometrio debido a la proliferación celular y al edema que se presenta. El edema comienza en las partes más profundas del tejido, cercano al miometrio, y gradualmente se propaga. También comienza a notarse el crecimiento glandular aunque sin grandes ramificaciones. El miometrio aumenta su tonicidad y las células epiteliales se hacen más altas (Asdell, 1955; Bonafos y col., 1995; Constantin and Meissonnier, 1981; Jones and Hunt, 1997).

Durante el estro se alcanzan los niveles máximos de edema endometrial e hiperemia; y durante el metaestro, el edema comienza a disminuir a partir del segundo día del ciclo estral debido a que hay colapso de algunos vasos sanguíneos de la mucosa (Asdell, 1955).

Durante el diestro, bajo el dominio de la progesterona, el endometrio cambia sus características hacia un epitelio de tipo secretor. Las células aumentan en tamaño y número, y es notorio el crecimiento glandular con ramificaciones y secreción. Hacia los últimos cuatro días del diestro, el endometrio comienza su regresión, las glándulas se acortan cesando su producción y el epitelio disminuye de tamaño. (Dellmann and Brown, 1993; Jones and Hunt, 1997).

Junto con los cambios antes mencionados, se han descripto una mayor llegada de células blancas en determinados momentos del ciclo estral. A pesar de que la existencia de variaciones en dichas células se conoce de larga data, no hay un acuerdo total entre diferentes informes (Dhaliwal y col., 2001). La presencia de un mayor número de linfocitos entre el d 3 y 5 del ciclo estral y la de PMN desde el fin del proestro hasta el d 3 o 4 del ciclo ha sido reportada por Dellman (Dellmann and Brown, 1993). El aumento de PMN coincide con la descripción de Kojima y Selander, quienes los encontraron

relacionados con el estro y el metaestro (Kojima and Selander, 1969). Por otro lado, la descripción de Ohtani es un ejemplo que difiere de lo anterior, ya que describe la llegada e infiltración de PMN por debajo del epitelio superficial los d 7-8 del ciclo, habiendo tomado como d 0 al comienzo del estro (Ohtani y col., 1993).

Si bien en los últimos años algunos trabajos han utilizado la citología endometrial para el diagnóstico de ES (Gilbert y col., 2005; Hammon y col., 2006; Kasimanickam y col., 2004) (Galvão y col., 2009 ; Galvão y col., 2011; Plontzke y col., 2010; Westermann y col., 2010) (McDougall y col., 2011), ninguno de ellos ha estudiado la variación del porcentaje de PMN durante el ciclo estral de la vaca. El hecho de que en cierto momento del ciclo se presente un mayor porcentaje de PMN en las capas más superficiales del útero, plantea la posibilidad de que el diagnóstico de ES pueda verse alterado. Como fue explicado anteriormente, el porcentaje de PMN es determinante de un diagnóstico positivo o negativo a dicha afección, y un aumento fisiológico de PMN aumentaría el diagnóstico de falsos positivos aumentando así la prevalencia de la ES.

En resumen, conociendo que el CB es la mejor técnica para la obtención de citologías uterinas y que refleja en forma práctica los cambios a nivel endometrial, se planteó la necesidad de estudiar las variaciones fisiológicas del porcentaje de PMN durante el ciclo estral con el objeto de poder descartar posibles resultados falsos positivos debidos a variaciones fisiológicas de PMN. Por lo tanto, el objetivo general de este capítulo fue estudiar las variaciones fisiológicas del porcentaje de PMN en el endometrio durante el ciclo estral por medio de la técnica de CB.

Los objetivos particulares de este capítulo fueron:

- Estudiar las variaciones del porcentaje de PMN a lo largo del ciclo estral en vacas sincronizadas y negativas a EC.
- Estudiar las variaciones del porcentaje de leucocitos mononucleares y el tamaño de las células endometriales a lo largo del ciclo estral en vacas sincronizadas y negativas a EC.

Las hipótesis más relevantes de este capítulo fueron:

- El porcentaje de PMN no varían a lo largo del ciclo estral en vacas sincronizadas y negativas a EC.
- El porcentaje de leucocitos mononucleares y el tamaño de las células endometriales no varía a lo largo del ciclo estral en vacas sincronizadas y negativas a EC.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental y animales

Para este experimento se utilizaron hembras bovinas (*Bos taurus*) de raza Holando Argentino pertenecientes al tambo comercial Las Dos Marías ubicado en la localidad de Marcos Paz, provincia de Buenos Aires. El experimento se realizó entre octubre y diciembre del 2009. Se utilizaron vacas en postparto (n=53) que se encontraban entre 27 y 56 dpp al momento del comienzo de la toma de muestras (d 0). Los animales incluidos en el experimento, debían tener una CC ≥ 2.5 , no haber padecido

abortos, distocias ni retención de placenta en su último parto y encontrarse ciclando y en buen estado de salud general.

En primer lugar, se realizó el examen general del animal, la evaluación del tracto reproductivo por PT y la evaluación del flujo vaginal mediante la técnica de FL descrita en el Capítulo II. Se seleccionaron aquellas vacas sin EC, con flujo normal translúcido y sin rastros de pus (F0). Los ovarios de las vacas seleccionadas fueron evaluados mediante ecografía (Mindray™ 6600Vet, Nanshan, China; sonda de 7.5 MHz), y aquellos animales con imágenes ováricas compatibles con aciclia (ausencia de CL y folículos mayores a 8 mm de diámetro), no fueron incluidos en el experimento.

Las vacas seleccionadas (n=30) fueron sincronizadas según el protocolo Ovsynch (Pursley y col., 1997). A todas las vacas se les aplicó una primera dosis de 8 µg de buserelina ([Hormona liberadora de gonadotrofinas, GnRH], Gonaxal- Biogenesis Bago, Argentina; d -9), una dosis de 150µg de un análogo sintético de Prostaglandina F_{2α} siete días más tarde (D-Cloprostenol, Enzaprost DC-Biogénesis Bagó, Argentina; d -2), y una segunda dosis de GnRH dos días más tarde (d 0). Todos los animales sincronizados (n=17) fueron muestreados el d0 (estro), d4 (metaestro), d11 (diestro), y d18 (proestro). El día 0 fue tomado como el último día de la sincronización, 12 h luego de la segunda dosis de GnRH. La disminución de la cantidad de animales entre la selección para la sincronización (n=30) y los animales muestreados (n=17), se debió a que algunos animales no respondieron al protocolo de sincronización Ovsynch (evaluado por características del útero a la PT) y a que otros no se encontraron presentes en el momento del muestreo, por lo que fueron descartados del estudio.

Se tomaron muestras de citología mediante de la técnica de CB y de sangre mediante punción de la vena de la cola los días 0, 4, 11 y 18 del ciclo estral de todos los

animales sincronizados. Las muestras de sangre fueron centrifugadas y almacenadas a -20°C hasta que se realizó la medición de las concentraciones séricas de P₄ mediante un kit comercial de RIA en fase sólida (Coat-A-Count, Progesterone; Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). El coeficiente de variación intra-ensayo para el pool alto de P₄ (6,45 ng/ml) fue de 5,14% y para el pool bajo de la misma hormona (0,8 ng/ml) fue de 10,21%.

Las muestras de citología endometrial fueron procesadas de la misma manera que se describió previamente Capítulo II. Luego se montaron usando un cubreobjetos de 50 x 25 mm, xilol y bálsamo de Canadá sintético para la preservación de la morfología celular. En cada muestra de citología endometrial se determinó el porcentaje de PMN y de células blancas mononucleares sobre las células totales. El conteo se realizó a ciegas por dos evaluadores y por triplicado.

Posteriormente, se tomaron fotos de las citologías endometriales a 1000 aumentos con microscopio binocular (Olympus BX40, Japón) conectado a una video cámara (Sony CCD-IRIS/RGB, Japón). Este equipamiento se encontraba conectado a una computadora Power Mac G4.

El análisis de las fotografías se realizó mediante el software Apple video player (Quick Time®, Cupertino, USA; 4 fotografías por preparado) con una magnificación de 1000 aumentos. Sobre las fotos se realizó la citometría de las células endometriales con el programa ImageJ de procesamiento de imágenes de dominio público (NIH, USA). Por medio de este software, se midió área (μ^2), perímetro (μ) diámetro de Feret (μ) de 10 células endometriales por preparado.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por los procedimientos GENMOD y MIXED de SAS (SAS, 2011; Wolfinger and Chang, 1995). Se evaluaron los conteos de PMN y de células mononucleares (GENMOD, distribución binomial, función Logit), el tamaño de las células endometriales (área celular, perímetro y diámetro de Feret) y las concentraciones de P₄ sérica durante los diferentes días de muestreo (PROC MIXED para mediciones repetidas en el tiempo). Además, se utilizaron funciones polinómicas lineales, cuadráticas y cúbicas para determinar el efecto del tiempo (días del ciclo estral) sobre las variables dependientes.

La concordancia entre los diagnósticos de ES obtenido por los diferentes operarios se evaluó mediante el índice Kappa (procedimiento FREQ de SAS®, (SAS, 2009). Para esto, el conteo de PMN fue realizado a ciegas en cada muestra por dos operarios diferentes y luego fueron clasificadas en positivas y negativas de acuerdo al porcentaje de PMN y a los dpp según la escala descrita anteriormente (Madoz y col., 2010). Una vez obtenidas las categorías, se realizó el análisis de concordancia mediante el cálculo índice Kappa para los resultados obtenidos por dos evaluadores distintos y para las dos evaluaciones a ciegas por el mismo operario.

RESULTADOS

Las concentraciones séricas de P₄, variaron en forma significativa entre los días del ciclo estral (d0, 0,42 ±0,42; d4, 1,16±0,43; d11, 4,69±0,44; d18, 2,85 ±0,46 ng/ml; P<0,01; Figura 3.1 A y B). Dichos cambios en las concentraciones de P₄ fueron explicados por una función polinómica cúbica (P<0.001).

Todas las vacas muestreadas resultaron negativas a ES ya que los porcentajes de PMN siempre estuvieron por debajo de los valores de corte determinados para el diagnóstico de ES ($<4-8\%$, 21-62 dpp). De hecho, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de PMN entre los diferentes días del ciclo estral ($1,51 \pm 0,50$, $P > 0,64$; Figura 3.1 A). El porcentaje de mononucleares, al igual que el de PMN, tampoco mostró diferencias significativas entre los distintos días del ciclo estral ($1,44 \pm 0,32$, $P > 0,06$; Figura 3.1 B).

Los conteos de PMN mostraron alta correlación entre dos conteos de la misma muestra por un mismo operador (índice Kappa 0,81) o por distintos operadores (índice Kappa 0,76).

El área, el perímetro y el diámetro Feret de las células endometriales no varió entre los días del ciclo estral ($361,16 \pm 24,26 \mu^2$, $P > 0,12$; $74,84 \pm 2,32 \mu$, $P > 0,37$; $27,76 \pm 0,85 \mu$, $P > 0,48$; Tabla 3.1.)

Figura 3.1. Cuadrado medio mínimo (CMM) y error estándar (EE) de las concentraciones de progesterona y del porcentaje de PMN (A) y de las concentraciones de progesterona y del porcentaje de leucocitos mononucleares (B) durante el ciclo estral en vacas sin EC y sincronizadas con un protocolo Ovsynch.

Tabla 3.1. Cuadrado medio mínimo (CMM) y error estándar (EE) de las concentraciones de progesterona y del área, perímetro y diámetro de Feret de las células endometriales durante el ciclo estral en vacas sin EC y sincronizadas con un protocolo Ovsynch.

	Día 0	Día 4	Día 11	Día 18	P
Progesterona (ng/ml)	0,42±0,42	1,16±0,43	4,69±0,44	2,85±0,46	<0,00
Área cel. endom. (μ^2)	328,4±22,	385,3±22,	338,9±26,	391,9±26,	>0,12
Perímetro cel. endom. (μ)	73,48±2,0	77,02±2,1	72,18±2,5	76,71±2,5	>0,37
Diámetro Feret cel. endom. (μ)	27,20±0,7	27,96±0,8	27,03±0,9	28,85±0,9	>0,48

DISCUSION

Los resultados de este capítulo permiten aceptar la hipótesis planteada que el porcentaje de PMN no varía a lo largo del ciclo estral en vacas ciclando y negativas a EC. Mediante el uso de un protocolo de sincronización de celos como el Ovsynch, fue posible sincronizar el inicio del ciclo en todas las vacas experimentales y de esta forma estudiar las variaciones de los conteos de PMN a lo largo del ciclo estral. A nuestro saber, este es el primer trabajo que ha estudiado las variaciones en el porcentajes de PMN durante el ciclo estral en vacas normales sin EC.

Las concentraciones séricas de P_4 descriptas en las vacas sincronizadas mostraron variaciones de acuerdo al momento del ciclo en que se encontraban los animales en el día del muestreo, demostrando claramente la efectividad del protocolo utilizado. Dichas concentraciones estaban por debajo de 1 ng/ml en el día del celo (d0),

luego fueron aumentando paulatinamente durante el metaestro (d4) hasta alcanzar su máxima concentración durante el diestro (d11) para luego descender durante el proestro (d18). La curva obtenida en este estudio coincide con las variaciones normales de concentración de P_4 durante el ciclo estral bovino reportadas previamente por otros autores (Forde y col., 2011; Hansel, 1959; Hansel and Convey, 1983).

Varios trabajos, incluyendo este trabajo de tesis, han determinado los puntos de corte del conteo de PMN para el diagnóstico de ES utilizando una curva ROC (Kasimanickam y col., 2004) [10-18%]; (Galvão y col., 2009) [4-8,5%]; (Madoz y col., 2010), Capítulo IV, 4-8%); cuartiles (McDougall y col., 2011) o un valor arbitrario (Gilbert y col., 2005) [5%]; (Hammon y col., 2006) [25%]; (Galvão y col., 2010) [$>10\%$]; (Plontzke y col., 2010) [5%]. El uso de una curva ROC (acrónimo de Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor) es probablemente el método más adecuado para el cálculo de dichos valores de corte debido a que por un lado, permite buscar el punto de máxima sensibilidad y especificidad y por el otro lado, permite correlacionar el porcentaje de PMN con el IPC.

Tanto en este trabajo, (Capítulo IV) como en otros trabajos que han utilizado las curvas ROC para determinar el punto de corte en el porcentaje de PMN (Galvão y col., 2009 ; Kasimanickam y col., 2004), los puntos de corte han sido siempre superiores al 4%. El hecho de que en este trabajo el porcentaje de PMN durante las diferentes etapas del ciclo estral haya sido en promedio de 1.51% confirma que la curva ROC clasifica en forma correcta las vacas con ES, y que recién a partir de 4% a 8% de PMN comienza a disminuir la fertilidad en las vacas con ES.

El coeficiente Kappa permite conocer el nivel de acuerdo o concordancia entre dos evaluadores frente a una misma muestra o entre una misma muestra evaluada por un

mismo evaluador en dos ocasiones diferentes. La magnitud del índice Kappa está influenciada mayormente por la extensión del acuerdo y por la prevalencia de la afección en estudio (Dohoo y col., 2003). Si bien el índice Kappa varía entre 0 (nulo) y 1 (máximo), cuando es mayor a 0,7 indica un alto nivel de concordancia entre los evaluadores (SAS, 2009). En este estudio, cuando una misma muestra de CB fue evaluada por un mismo operador en dos momentos diferentes, el índice Kappa tuvo un valor de 0,81 demostrando un alto nivel de concordancia entre ambas lecturas del porcentaje de PMN. Asimismo, cuando una misma muestra de CB fue evaluada dos evaluadores diferentes, el índice Kappa tuvo un valor de 0,77, también demostrando un alto nivel de concordancia entre ambos evaluadores.

A pesar de que existen varios estudios publicados en los últimos años sobre el uso CB para el diagnóstico de ES, en un solo estudio previo se utilizó el índice Kappa para evaluar el grado de concordancia entre dos evaluadores frente a una misma muestra (Gilbert y col., 2005). En dicho estudio obtuvieron un índice Kappa mayor a 0,70 (0,86), muy similar al obtenido en este trabajo. Sin embargo, a nuestro saber, este es el único trabajo que ha demostrado un alto nivel de concordancia (0,81) entre dos lecturas del porcentaje de PMN realizadas por un mismo evaluador.

Los datos obtenidos en este estudio nos permiten descartar la posibilidad de que ocurran fallas en el diagnóstico de ES por la técnica de CB debidas a cambios uterinos fisiológicos en vacas de postparto. Esto quedo principalmente demostrado al no encontrarse variaciones significativas en el porcentaje de PMN a lo largo del ciclo, contrariamente a lo que se podría esperar, conociendo que existe una mayor llegada de células inflamatorias en las etapas del estro y el metaestro durante el ciclo estral normal de la hembra bovina. Probablemente dichos cambios no afectan al cepillado diagnóstico

debido a que no se producen superficialmente, sino que la llegada de células inflamatorias abarca porciones más profundas del endometrio, ubicándose principalmente por debajo del epitelio superficial (Ohtani y col., 1993), por lo que no son recogidas durante la toma de muestras. Similar explicación podría darse a la falta de variaciones significativas en el porcentaje de mononucleares a lo largo del ciclo estral.

Con respecto al tamaño de las células endometriales, este no varió significativamente a lo largo del ciclo. Si bien es conocido que el epitelio superficial uterino cambia (epitelio cilíndrico y pseudoestratificado) según el momento del ciclo y el nivel hormonal que predomine; no se han encontrado diferencias morfométricas en las células medidas en el extendido citológico obtenido con el CB. Esto puede ser debido a que las mediciones de área, perímetro y diámetro de Feret de las células endometriales fueron tomadas directamente sobre los frotis donde puede ser que estas no conserven sus dimensiones originales.

Los resultados demuestran que a pesar de los cambios cíclicos fisiológicos que ocurren en el útero, el diagnóstico de ES por la técnica de CB, no se encuentra alterado y que el mismo refleja los cambios inflamatorios que ocurren en el endometrio.

CONCLUSIONES

Los resultados de este capítulo demuestran que el porcentaje de PMN no varía a lo largo del ciclo estral en vacas normales sin EC, y que por lo tanto el diagnóstico de ES por la técnica de CB refleja los cambios inflamatorios que ocurren en el endometrio.

CAPITULO IV

DETERMINACION DE LOS PUNTOS DE CORTE PARA EL DIAGNOSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLINICA POR LA TECNICA DE CYTOBRUSH Y ESTUDIO DE SU PREVALENCIA E IMPACTO SOBRE LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA EN VACAS DE TAMBO

INTRODUCCION

Hasta el año 2006, debido a la falta de homologación de los términos referidos a la definición del caso clínico de las distintas alteraciones uterinas del postparto bovino, existía gran variación en los informes de diagnóstico y prevalencia de las metritis y las endometritis en vacas lecheras. Esto se debía principalmente a diferencias en cuanto al momento en que se realizaba el muestreo y a la prueba de diagnóstico utilizada.

Según gran parte de las publicaciones, se podría considerar que en ausencia de EC una vaca es diagnosticada positiva a ES cuando la citología endometrial presenta $\geq 18\%$ PMN para muestras tomadas entre los 21-33 dpp, o $\geq 10\%$ PMN para muestras entre 34-47 dpp; (Kasimanickam y col., 2004; Sheldon y col., 2006). A pesar de que estos valores de corte son los aceptados por la mayoría de los investigadores, no existe consenso total, variando los valores de corte entre 4 y 25% PMN (Galvão y col., 2009 ; Hammon y col., 2006); basadas en estas diferencias, las interpretaciones y comparación de resultados entre diferentes estudios se hace controversial. Esto se complica más aún, al extrapolar datos reproductivos relacionados con ES de animales bajo sistemas de

explotación estabulados a nuestro sistema de producción pastoril ya que la prevalencia de ES en Argentina, -al igual de lo que sucede con la EC-, es más baja que en Europa y en Norteamérica, muy probablemente debido a las diferencias en los sistemas de producción.

Mientras que en un estudio en el que se utilizó un valor de corte arbitrario del 5% de PMN, se reportó una prevalencia promedio de ES del 53% con un rango entre ambos del 37% a 74% (Gilbert y col., 2005); en otro estudio en donde se validó la técnica y se utilizaron valores de corte del 18% de PMN para vacas muestreadas entre 20 y 33 dpp y del 10% de PMN entre 34 y 47 dpp, la prevalencia de ES fue del 34% (Kasimanickam y col., 2004). Barlund también utilizó a la citología endometrial como diagnóstico pero tomando un 8% de PMN como punto de corte, y la prevalencia de ES encontrada fue de 11.8% en animales entre 28 y 41dpp (Barlund y col., 2008).

En la actualidad existen sólo dos reportes de trabajos de ES realizados en la Argentina; los mismos utilizaron diferentes puntos de corte, ambos elegidos arbitrariamente y fueron del 10% (Feresin y col., 2006) y del 5% (Plontzke y col., 2010). Las prevalencias encontradas fueron del 17.1% entre 15 y 80 dpp y del 38 y 19% para los rangos de 18 a 38 y 32 a 52 dpp respectivamente.

En resumen, no existe un punto de corte para el diagnóstico de ES que relacione con una real disminución en la eficiencia reproductiva que pueda ser aplicado directamente al sistema argentino de explotación pastoril. Los estudios publicados fueron llevados a cabo en su mayoría en explotaciones intensivas y varían en los puntos de corte que aplican y en los dpp de los animales muestreados. Esto hace que las comparaciones, y más aún la extrapolación de estos datos al sistema argentino, no

reflejen la situación real de las hembras lecheras, generando posibles interpretaciones erróneas.

Debido a lo anteriormente expuesto, y a que con sólo cambiar el nivel de corte cambia notablemente la prevalencia de ES, el principal objetivo de este capítulo ha sido validar la técnica de CB en nuestro país y buscar los niveles de corte que se correspondan con una disminución de la eficiencia reproductiva de acuerdo a la metodología descrita por Dohoo (Dohoo y col., 2003), evitando así extrapolar en forma directa resultados de trabajos llevados a cabo bajo sistemas intensivos. Todo esto con el fin de poder diagnosticar correctamente y tratar a estos animales en tiempo y forma, mejorando así el ambiente uterino para la potencial gestación.

Los objetivos específicos de este capítulo fueron:

- Validar para el sistema argentino de producción pastoril los puntos de corte (porcentaje de PMN) según los dpp para el diagnóstico de ES por la técnica de CB.
- Determinar la prevalencia de ES entre los 21 y 62 dpp en vacas de tambo bajo sistema de producción pastoril.
- Evaluar el impacto de la ES sobre la eficiencia reproductiva de las vacas de tambo.

Las hipótesis principales hipótesis fueron:

- La prevalencia de ES en Argentina en vacas de tambo es más baja que la comunicada por los países con sistemas intensivos de explotación.

- La ES afecta negativamente a la eficiencia reproductiva debido a que aumenta el IPC y los días de vaca vacía.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental y animales

El estudio se llevó a cabo en cuatro tambos comerciales de la provincia de Buenos Aires; ubicados en América, Brandsen, Carlos Casares y Carmen de Areco. Se utilizaron vacas (n=487) de raza Holando Argentino en lactancia paridas entre enero del 2006 y noviembre del 2007. Las vacas fueron examinadas entre los 21 y 62 dpp durante la visita mensual del veterinario asesor del establecimiento. En dicha visita, las vacas eran observadas externamente para detectar la presencia de descargas externa de flujo uterino en la cola, periné y vulva, e internamente mediante el examen del flujo vaginal mediante la técnica descrita en el Capítulo II. Las vacas que poseían descarga uterina anormal fueron diagnosticadas con EC y fueron descartadas del estudio. Asimismo, no fueron incluidas en el estudio las vacas que habían recibido terapia antibiótica durante la semana previa al momento del estudio. También se recolectaron los datos del número de lactancia (1 y ≥ 2), estación de parto (verano, diciembre-marzo; otoño, marzo-junio; invierno, junio-septiembre; primavera, septiembre-diciembre), distocia y mellizos y enfermedades post parto (hipocalcemia, cetosis, retención de placenta). El diagnóstico de gestación se realizó mediante PT entre los días 35 y 65 post IA.

Las muestras de citología endometrial fueron recolectadas mediante la técnica de CB modificada y evaluadas como fue descripto en el Capítulo II.

Análisis estadístico

Las medidas de eficiencia reproductiva analizadas fueron IP1S, el IPC (días de vaca vacía), el porcentaje de preñez a la primera inseminación (PP1IA), el porcentaje de preñez a los 100 dpp (PRE100), y el porcentaje de vacas vacías a los 200 dpp (VAC200).

El punto de corte del porcentaje de PMN fue obtenido mediante el análisis de la curva ROC (Dohoo y col., 2003) utilizando el paquete estadístico y de gráficos SigmaPlot 11® (Systat Software Inc., San José, CA, USA). Se graficó la sensibilidad y la especificidad para cada porcentaje de PMN posible en un curva ROC con la mediana de 100 días de IPC (días de vaca vacía) para la población en estudio. Los intervalos de dpp para los que se realizó el análisis de la curva ROC fueron los intervalos de 21-33 (INT21-33), de 34-47 (INT34-47), de 48-62 (INT48-62) y de 21-62 dpp (INT21-62).

El análisis estadístico de los datos se realizó con el paquete estadístico de SAS 9.1 (Cary, 1990). Los modelos se construyeron mediante la técnica de eliminación manual paso a paso. El valor de P de $<0,15$ fue utilizado como criterio de inclusión, y el valor de $P>0,15$ fue utilizado como criterio de exclusión.

Para verificar la asunción de proporcionalidad del riesgo de preñez de las vacas con y sin ES, los datos fueron estratificados mediante la variable ES, y una función de sobrevivencia de Kaplan-Meier fue estimada para cada grupo con el procedimiento LIFETEST de SAS (Allison, 1995). Los estimadores de la función de sobrevivencia de Kaplan-Meier fueron utilizadas para calcular las medianas del IPC y para graficar una función de empalme suave (spline) con el paquete estadístico y de gráficos SigmaPlot 11® (Systat Software Inc., San José, CA, USA).

La TR de preñez fue estimada utilizando un análisis multivariado de sobrevivencia mediante el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox con el procedimiento PHREG de SAS (Allison, 1995). El número de lactancias y la estación del parto fueron utilizados como covariables en el análisis. En el modelo de Cox, el cual es un método muy utilizado para análisis de supervivencia, la variable de respuesta se expresó como la TR de preñez, que representa la cuantificación del riesgo instantáneo de preñez por unidad de tiempo, o sea la velocidad a la que las vacas quedan preñadas diariamente (Fourichon y col., 2000).

Por último, las variables dicotómicas como el PP1IA, el PRE100, y el VAC200 fueron analizados por regresión logística con el procedimiento GENMOD de SAS (Allison, 1999).

RESULTADOS

Se muestrearon un total de 487 vacas, de las cuales luego de eliminar las vacas con <21 dpp (n=6) y >62 dpp (n=96) quedaron 385 vacas utilizadas para el cálculo de prevalencia de ES. Luego de eliminar los registros de animales con datos incompletos, el análisis estadístico de la eficiencia reproductiva se llevó a cabo sobre 347 animales. Para el análisis de la curva ROC, el cálculo de los valores de corte, el análisis de sobrevivencia de Kaplan-Meier y para el análisis multivariado de sobrevivencia mediante el análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox se utilizaron 319 vacas que poseían los datos de porcentaje de PMN e IPC.

La curva ROC identificó como puntos de cortes a $\geq 8\%$ PMN para el INT21-33, $\geq 6\%$ PMN para el INT34-47, $\geq 4\%$ para el INT48-62 y 5% para el INT21-62 (Figura

4.1. A, B, C y D respectivamente). En la Tabla 4.1 se encuentra el área bajo la curva, el error estándar, el intervalo de confianza (IC) del 95% y la probabilidad para el valor de corte para cada intervalo analizado. Usando los puntos de corte obtenidos de las curvas ROC, la prevalencia de ES calculada sobre vacas negativas a EC (n=385) fue de 21.5%, 16.0%, 16.0% y 19,7% para los INT21-33, INT34-47, INT48-62 y INT21-64 respectivamente.

Tabla 4.1. Análisis de curva ROC para estimar el porcentaje de corte de PMN, el área bajo la curva, el error estándar (EE), el 95% del intervalo de confianza (IC) y la probabilidad (P) para los intervalos de 21-33, 34-47, 48-62 y 21-62 dpp.

	n	% PMN	Área	EE	95% IC	P
21-33 dpp	78	8,0	0,65	0,06	0,52-0,77	0,02
34-47 dpp	150	6,0	0,59	0,04	0,49-0,68	0,05
48-62 dpp	91	4,0	0,62	0,05	0,50-0,74	0,03
21-62 dpp	319	5,0	0,60	0,03	0,54-0,67	0,0008

La Tabla 4.2 muestra la eficiencia reproductiva de las vacas normales y las vacas con ES. Las vacas con ES tuvieron una disminución del 16,2% del porcentaje de PRE11A y del 16,8% porcentaje de PRE100 comparado con las vacas normales ($P<0,02$, $P<0,01$; respectivamente); y un aumento del 7% del porcentaje de VAC200 ($P<0,10$). La relación entre la proporción de vacas vacías y los días vacías entre vacas normales y vacas con ES, se muestra en la Figura 4.2. Las vacas normales tendieron a preñarse más precozmente que las vacas con ES para los distintos intervalos: 21 a 33 dpp (Figura 4.2A; mediana de días vacíos [MDV]=89 vs 160 d, $P=0,08$) y 34 a 47 dpp (Figura 4.2B; MDV=90 vs 116,5, $P=0,07$); 48 a 62 dpp (Figura 4.2C; MDV=101 vs 132 d, $P=0,05$) y 21 a 62 dpp (Figura 4.2D; MDV=94 vs 123,5 d, $P=0,006$; Tabla 4.3). El número de lactancias y la condición corporal al momento del muestreo afectaron el

IP1S (Tabla 4.4); mientras que sólo el número de lactancias y la presencia de ES al momento del muestreo afectaron el IPC (Tabla 4.4). Por cada 1% de incremento del porcentaje de PMN, disminuyó 1,3% el riesgo instantáneo de preñez (Tabla 4.4). Para vacas con ES comparadas con vacas sin ES, la razón de riesgo de preñez fue de 0.64 y la tasa de preñez relativa fue de 36% ($P<0.01$). Las vacas sin ES quedaron preñadas antes que las vacas con ES ($P<0.01$).

Tabla 4.2. Razón de probabilidad (RP) de preñez, 95% del intervalo de confianza (IC) y probabilidad del porcentaje de preñez a la primera inseminación (PP1IA), del porcentaje de preñez a los 100 dpp (PRE100) y del porcentaje de vacas vacías a los 200 dpp (VAC200) en vacas con ES comparado con vacas normales.

	Porcentaje	RP ¹	IC 95%	P
PP1IA				
Normal	45,2 (109/241)	Referencia	Referencia	
E Subclínica	29,0 (18/62)	2,01	1,01-3,69	0,02
PRE100				
Normal	54,3 (132/243)	Referencia	Referencia	
E Subclínica	37,5 (24/64)	1,98	1,15-3,48	0,01
VAC200				
Normal	8,6 (21/243)	Referencia	Referencia	
E Subclínica	15,6 (10/64)	1,95	0,87-4,39	0,10

¹Regresión logística, procedimiento GENMOD de SAS.

Figura 4.1. Curva ROC para estimar el porcentaje de corte de PMN para el intervalo de 21 a 33 (A, 8% PMN), 34 a 47 (B, 6% PMN), 48 a 62 dpp (C, 4% PMN) y 21 a 62 dpp (D, 5% PMN).

Figura 4.2. Curva de sobrevivencia del porcentaje de vacas vacías y los días de vaca vacía para el intervalo de 21 a 33 (A; mediana de días vacíos [MDV]=89 vs. 160 d, $P=0,08$), 34 a 47 (B; MDV=90 vs. 116,5, $P=0,07$), 48 a 62 dpp (C; MDV=101 vs. 132 d, $P=0,05$) y 21 a 62 dpp (D; MDV=94 vs. 123,5 d, $P=0,006$).

Tabla 4.3. Análisis de sobrevivencia y análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox del intervalo parto 1 servicio (IP1S) y parto concepción (IPC) en vacas normales y con ES.

	N	Mediana ¹	IC 95% ¹	P ¹	TR ²	IC 95% ²	P ²
IP1S							
Normal	255	68,0	66,0-70,0	0,96	Referencia	Referencia	0,95
E Subclínica	61	69,0	63,0-75,0		0,99	0,74-1,31	
IPC							
Normal	254	94,0	88,0-101,0	0,006	Referencia	Referencia	0.0098
E Subclínica	64	123,0	101,0-147,0		0,68	0,52-0,91	

¹Análisis de sobrevivencia, procedimiento LIFETEST de SAS;

IC 95%: intervalo de confianza del 95%,

²TR: Tasa de riesgo, regresión de riesgos proporcionales de Cox, procedimiento PHREG de SAS.

Tabla 4.4. Análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox¹ del intervalo parto 1 servicio (IP1S) y parto concepción (IPC).

	n	TR	IC 95%	P
IP1S				
	212			
Lactancia				0,13
1		Referente	Referente	
≥2		0,80	0,61-1,06	
Condición Corporal				0.02
≤2,5		Referente	Referente	
>2,5		1,38	1,05-1,83	
IPC				
	208			
Lactancia				0,03
1		Referente	Referente	
≥2		0,73	0,54-0,97	
Endometritis subclínica				0.07
Normal		Referente	Referente	
E Subclínica		0,73	0,52-1,06	
Porcentaje PMN ²	305	0,98	0,97-1,00	0,06

Procedimiento PHREG de SAS; P<0,15 del efecto para entrar y salir del modelo
 Por cada 1% de incremento del porcentaje de PMN, disminuye 1,3 % el riesgo instantáneo de preñez.

DISCUSION

Con la realización de este estudio, se pudo validar por primera vez la técnica de CB en nuestro país, y determinar los niveles de corte que se corresponden con una disminución de la eficiencia reproductiva. Además, también se pudo determinar la prevalencia de ES y su impacto sobre la eficiencia reproductiva en tambos comerciales.

Los valores de corte calculados en este trabajo fueron inferiores a los calculados en Canadá, 18% y 10% (Kasimanickam y col., 2004) pero muy similares a los usados en USA por Gilbert, 5% (Gilbert y col., 2005), Galvão 8.5, 6.5 y 4.0% (Galvão y col., 2009) y en Alemania por Raab, 5% (Raab y col., 2004). Estos resultados confirman los hallazgos reportados en el capítulo III. Los valores de corte reportados en este capítulo demuestran que comienza a haber disminución de la eficiencia reproductiva a partir de un porcentaje de PMN del 8% al 4% según los dpp; y en el capítulo III quedo demostrado que en las vacas normales de porcentaje PMN nunca supera el 2% durante el ciclo estral. Por lo tanto, integrando los resultados de ambos trabajos, tomando todos los datos en conjunto, queda claro que en vacas normales el porcentaje de PMN no debería superar el 5%, ya que a partir de este umbral comenzaría a disminuir la eficiencia reproductiva.

La prevalencia total de ES encontrada (17% 21-62 dpp) fue menor a la encontrada por Raab (41,3% 21-27 dpp y 16,4% 35-41 dpp), Kasimanickam (35,1% 20-33 dpp y 34% 34-47 dpp), Gilbert (53% 40-60 dpp) y por Hammon 51,8% 25-31); similar a la encontrada por Feresin en Argentina (17,1% 15-80 dpp) y mayor que la hallada por Barlund (11,8% 28-41 dpp). En este punto, hay que tomar en consideración que en algunos de los trabajos (Barlund y col., 2008; Gilbert y col., 2005; Hammon y

col., 2006), la prevalencia fue medida sobre el total de vacas evaluadas y no sobre el total de vacas clínicamente sanas, por lo que se ve muy limitada la comparación con resultados obtenidos por otros autores. Por lo tanto, se confirmó una de nuestras hipótesis de trabajo de que bajo condiciones pastoriles, la prevalencia de ES sería menor que bajo condiciones de estabulación.

También se confirmó la otra hipótesis de trabajo, que la ES disminuye la eficiencia reproductiva. Los resultados de eficiencia reproductiva obtenidos muestran claramente que la ES afecta negativamente a la eficiencia reproductiva a vacas lecheras, aumentando los días de vaca vacía. Esto concuerda con la mayoría de los informes al respecto (Kasimanickam y col., 2004) (Galvão y col., 2009 ; Gilbert y col., 2005; Salasel y col., 2010) y disiente sólo con uno en el que informan no haber encontrado diferencias significativas entre vacas de tambo positivas y negativas a ES (Plontzke y col., 2010). Esta discrepancia se podría explicar, debido a que en el presente trabajo se utilizó un mayor número de animales que en el anterior, permitiendo tener un estudio con mayor potencia, que permitió detectar estas diferencias previamente no detectadas.

CONCLUSIONES

La prevalencia de ES diagnosticada por la técnica de CB, en vacas lactantes de tambo bajo sistema de producción pastoril fue del 17%. Las vacas con ES tuvieron 16.2% de reducción en la tasa de concepción al primer servicio, 16.8% de disminución en la cantidad de vacas preñadas a los 100 días de lactancia, y 29 días más de días abiertos comparado todo con vacas sin ES. Se identificaron como puntos de cortes a $\geq 8\%$ de PMN para el INT de 21-33dpp, $\geq 6\%$ de PMN para el INT de 34-47dpp, $\geq 4\%$ de

PMN para el INT de 48-62dpp, y $\geq 5\%$ para el INT de 21-62 dpp para el diagnóstico de ES por la técnica de CB.

CAPITULO V

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DE LA ENDOMETRITIS SUBCLINICA

INTRODUCCION

La mayoría de los procesos inflamatorios postparto del útero comienzan con la contaminación de la cavidad uterina. Antes del parto, el útero se encuentra estéril, y si eventualmente llegara a ocurrir una invasión de bacterias, usualmente se produce la muerte del embrión o el aborto del feto. Durante el parto, las barreras físicas del cérvix, la vagina y la vulva son franqueables, y las bacterias que provienen del medio ambiente, la piel del animal y la materia fecal tienen la oportunidad de ascender por el tracto reproductivo. De hecho, durante el parto y postparto, la contaminación del útero es inevitable en el bovino; pero no necesariamente está asociada con enfermedad clínica. Luego del parto, y durante las dos a tres primeras semanas postparto, la contaminación bacteriana del útero bovino es una situación dinámica, con contaminación frecuente, eliminación de las bacterias y re contaminación (Sheldon and Dobson, 2004). El desarrollo de la afección uterina depende de la respuesta inmune de la vaca, y de las especies y número de bacterias. Si bien el número de bacterias patógenas en el útero de postparto puede ser lo suficientemente grande como para superar los mecanismos de defensa del útero, causando infecciones graves (metritis puerperales), esto rara vez ocurre, y en la mayoría de los casos las infecciones uterinas son localizadas y están más comúnmente asociadas con disminución de la eficiencia reproductiva (endometritis) (Sheldon y col., 2006). Cabe destacar, que la sola presencia de infección bacteriana en el útero, no está siempre acompañada de manifestaciones clínicas de enfermedad, sino

que va a depender del estado inmune del huésped (Földi y col., 2006) Por otro lado, el útero es protegido por mecanismos de defensa local y sistémico, y ambos son influenciados por los niveles de hormonas esteroideas, estrógenos y progesterona. En general, se considera que el tracto genital es más resistente a las infecciones cuando se encuentra bajo el dominio de los estrógenos, y por lo contrario, más susceptible bajo el dominio de la progesterona (Noakes y col., 2001).

Los microorganismos aislados de úteros infectados, son generalmente encontrados en el entorno del ganado y son capaces de infectar otros tejidos y órganos; esto hace que a las infecciones uterinas se las considere como infecciones no específicas. En ellas, se ven involucradas un amplio rango de especies bacterianas (Rutter y col., 1999; Sheldon y col., 2002), y se han encontrado gran cantidad de ellas en distintas combinaciones en aislamientos de úteros infectados (Azawi, 2008)

Basándose en la literatura publicada, las bacterias aisladas pueden ser clasificadas de acuerdo con su potencial patogenicidad dentro del útero en:

1. Patógenos uterinos reconocidos, asociados con lesiones en el endometrio bovino
-bacterias que frecuentemente causan endometritis-. *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum* y *Prevotella spp.*
2. Patógenos potenciales, frecuentemente aislados del lumen del útero bovino y de casos de endometritis, pero que no están comúnmente asociados con lesiones uterinas- bacterias que raramente causan endometritis- *Acinetobacter spp*, *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Mannheimia haemolytica*,

Pasteurella multocida, *Peptostreptococcus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*.

3. Contaminantes oportunistas aislados del útero y no asociados con endometritis - bacterias no reconocidas como patógenos uterinos- *Aerococcus viridans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium* spp, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus* spp, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Proteus* spp, *Propionobacterium granulosa*, *Staphylococcus* spp (coagulasa-negativos), *Streptococcus* α -hemolíticos, *Streptococcus acidominimus* (Bonnett y col., 1993; Farin y col., 1989; Laven y col., 2000; Noakes y col., 1989; Noakes y col., 1991; Olson y col., 1984; Petit y col., 2009; Ruder y col., 1981; Sheldon and Dobson, 2004; Williams y col., 2005).

Es numerosa la cantidad de estudios de aislamiento bacteriano que se han realizado en vacas de postparto, con muestras obtenidas por diversas técnicas. Dentro de los tipos de muestreo del útero se han citado: el hisopado uterino, la biopsia endometrial, el lavaje uterino y el cepillado endometrial (Jeremejeva y col., 2010; Messier y col., 1984; Santos y col., 2010; Sheldon y col., 2002; Westermann y col., 2010; Williams y col., 2005) y dentro de los muestreos de origen vaginal, la aspiración del flujo vaginal y el hisopado (Campero y col., 1992; Rutter y col., 1999). Estos estudios se han realizado en presencia de distintas enfermedades del tracto reproductivo como la endometritis clínica, metritis séptica, vaginitis (Messier y col., 1984; Santos y col., 2010; Westermann y col., 2010; Williams y col., 2005) o bien sobre animales que habían presentado predisponentes como la retención de membranas fetales o partos

distócicos (Campero y col., 1992; Rutter y col., 1999). También se ha utilizado al aislamiento para la comparación de resultados al tratamiento con antibióticos y hormonas (Jeremejeva y col., 2010). Si bien, como se ha dicho, existen diversos estudios sobre el tema, a nuestro conocimiento, no existen publicaciones que describan aislamientos bacterianos en vacas positivas a ES.

En resumen, la infección uterina bacteriana es no específica, e involucra un amplio rango de especies bacterianas de distinta patogenicidad. El estado inmunológico de la hembra es importante para el desarrollo de la afección uterina. Actualmente, no existen informes de aislamientos bacterianos en vacas clínicamente sanas con ES en nuestro país bajo condiciones de lechería pastoril. El hecho de llegar a conocer si la ES se encuentra o no asociada con alguna bacteria patógena en particular, permitiría profundizar los conocimientos en el tema y la posibilidad de desarrollar y aplicar un tratamiento específico para mejorar los porcentajes de preñez en las vacas afectadas.

- El objetivo de este capítulo fue determinar la presencia de agentes bacterianos involucrados en la ES.
- La hipótesis planteada fue que las bacterias aisladas del útero de animales con ES, no varían de aquellas que se comunican en casos de EC.

MATERIALES Y METODOS

Diseño experimental y animales

Se utilizaron hembras bovinas (*Bos Taurus*) de raza Holando Argentino pertenecientes al tambo comercial Las Dos Marías, ubicado en la localidad de Marcos Paz, provincia de Buenos Aires. El estudio se realizó entre septiembre y diciembre del 2010, y se utilizaron 60 vacas entre 21-62 dpp al momento del muestreo. Los criterios de inclusión que se usaron fueron: $CC \geq 2.5$, animales que además de cumplir con los dpp no habían presentado abortos, distocia, retención de placenta, mellizos, nacidos muertos en su última parición y que además no habían recibido terapia antibiótica previa al inicio del estudio.

A cada hembra incluida en el experimento, se le realizaba una inspección general, PT y el diagnóstico de EC y de ES por la técnica de FL y por la técnica del CB respectivamente, ambas descriptas en profundidad en el Capítulo II.

Las muestras fueron tomadas de vacas con diagnóstico de F0 con citología positiva a ES y de vacas con citología negativa a ES (controles negativos) según los puntos de corte determinados en el capítulo IV. Asimismo, un cierto número de vacas con distintos grados de flujo purulento (F1 y F2), fueron también muestreadas y se las consideraron como controles positivos.

Las muestras para bacteriología fueron obtenidas por medio de una técnica similar a la de CB pero con doble protección del cepillo, por lo que por encima de la vaina sanitaria descartable se colocó una manga sanitaria, la cual era desgarrada una vez alcanzada la luz del cuerno uterino a muestrear.

Una vez desmontado el cepillo de la pistola era colocado en tubos plásticos con medio de transporte Stuart (Eurotubo®, Deltalab, España). Los medios con las

muestras, eran mantenidos en caja aislante de telgopor con refrigerantes hasta su arribo al laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico (FCV-UNLP), donde se realizaron los cultivos y la identificación de las bacterias. Los extendidos citológicos se fijaron, tiñeron y evaluaron de la misma forma que en el Capítulo II.

Cultivo e identificación bacteriológica

Todas las muestras se sembraron para el diagnóstico de bacterias aerobias y anaerobias. Para el cultivo de bacterias aerobias, se utilizó el medio agar sangre base, con el agregado de 5% de sangre ovina desfibrinada (Baron y col., 1995). Las placas se incubaron por 48 horas a 37°C. Las bacterias se identificaron por las características macroscópicas: morfología de la colonia, coloración de Gram, tipo de hemólisis y pruebas bioquímicas convencionales (Baron y col., 1995).

Para el cultivo de bacterias anaerobias se utilizó el medio Agar Brucella, con el agregado de extracto de levadura, solución de hemina (5mg/ml), solución de vitamina K (1mg/ml) y sangre lacada (SADABEC, 1995). La atmósfera anaerobia se obtuvo por evacuación y reemplazo de gases: 5-10 % H₂, 5-10% CO₂, 80% N₂ (Anaeroincubator Hirayama Manufacturing Corporation). Se incubaron a 37°C durante 48 horas. Cuando no se observó desarrollo se reincubaron en anaerobiosis 7 días más. Las bacterias se identificaron sobre la base de características macroscópicas de las colonias, características microscópicas con la coloración de Gram, prueba de tolerancia al oxígeno y pruebas bioquímica convencionales (SADABEC, 1995).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico de SAS (SAS, 2003). La probabilidad de aislar *Arcanobacterium pyogenes* (*A. pyógenes*), se evaluó mediante el procedimiento GENMOD (SAS, 2003), con una distribución binomial y un enlace logit. Para ello se utilizaron tres modelos: el primero incluyó el efecto fijo del conteo de PMN (expresado en %) en la citología endometrial; el segundo, el efecto fijo del resultado de la citología a ES (Positiva vs. Negativa); y el tercero, el efecto fijo del tipo de flujo (F0 vs. F1 vs. F2).

RESULTADOS

Se evaluaron un total de 60 muestras citológicas y bacteriológicas. Del total de las muestras evaluadas, 73,3% (44/60), 11,6% (7/60) y 15% (9/60) correspondieron a animales que presentaban F0, F1 y F2 respectivamente. La prevalencia de ES encontrada fue de 13,5% (6/44) sobre el total de muestras tomadas en vacas F0.

Dentro de aquellos animales diagnosticados con EC por la técnica de recuperación de flujo vaginal (F1 y F2), se encontró que 28,5% (2/7) de F1 y 33,3% (3/9) de F2 presentaron conteos muy bajos de PMN a la citología, siendo incluso menores a los necesarios para dar como positiva la muestra a ES.

En todos los casos de animales positivos a ES, no se aislaron bacterias aerobias ni anaerobias. Sí se obtuvieron aislamientos en vacas clínicamente sanas y negativas a ES; entre ellas se encontraron ocho casos de bacterias aerobias y uno de anaerobias 23% (9 aislamientos/38 muestras) aunque ninguna se correspondió a la clasificación de

causante de lesiones uterinas. De las bacterias aisladas, el *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) fue el más comúnmente aislado 44.4% (4/9).

En diagnósticos de F2 con conteos de PMN por encima de los puntos de corte para ES, predominó ampliamente el *A. pyogenes* (4/6), mientras que en las dos vacas restantes no se obtuvieron cultivos de ningún tipo. De los casos encontrados de flujos compatibles con EC pero sin conteo de PMN por encima del nivel de corte, se logró sólo un aislamiento aerobio y ninguno anaerobio. El único aislamiento correspondió a SCN coincidiendo con el más comúnmente aislado en vacas clínicamente sanas. Figura 5.1 y 5.2

Con respecto al aislamiento de *A. pyógenes*, se encontró que el conteo de PMN posee efecto sobre la probabilidad de aislar dicha bacteria ($P=0,002$). La chance de su aislamiento aumenta en un 10% por cada 1% que aumenta el conteo de PMN (RP=1,10 IC 95% 1,8-18,95).

Cuando se evaluó la relación entre las citologías positivas (superiores al nivel de corte) y la probabilidad de aislamiento de *A. pyogenes*, se encontró un efecto ($P=0,002$), pero en este caso, no fue posible estimar el RP debido a que no hay aislamientos dentro de uno de los grupos (citologías negativas). En el tercer modelo aplicado (aislamiento de *A. pyógenes* vs. tipo de flujos), no se encontró efecto del flujo sobre la chance de aislar *A. pyógenes* ($P=0,992$); el modelo no pudo estimar el RP debido a que no existen vacas positivas sin EC.

Figura 5.1. Bacterias aisladas según el diagnóstico de EC (F1 y F2) y ES

Figura 5.2. Aislamientos de bacterias aerobias y anaerobias según diagnóstico de EC (F1 y F2) y ES

DISCUSION

El objetivo de este trabajo fue conocer si las bacterias comúnmente citadas en la bibliografía como presentes en los casos de EC se encontraban también en los casos de ES. El hecho de que la prevalencia de ES sea baja en nuestro sistema de explotación, hizo que tengamos que aumentar el número de muestras; aun así, la cantidad de casos encontrados fue bastante pequeña (6/44). Además se tomaron muestras de vacas con EC, que presentaban F1 y F2 al FL, con el fin de incorporar a ciegas al lote posibles resultados de aislamiento positivos (controles).

Uno de los hallazgos más sorprendentes, fue encontrar nuevamente una baja correlación entre los hallazgos del diagnóstico de EC y la citología uterina; cinco vacas que presentaban F1 y F2 al FL, no mostraron un conteo alto de PMN en la citología como sería lógico esperar; aquí nos encontramos con posibles falsos positivos. Es posible que la técnica de FL, al no permitir una visualización directa del contenido uterino, no permita distinguir entre aquellos cuadros de inflamación vaginal de lesiones en el endometrio, pudiendo de esta manera alterarse dicho diagnóstico. Estos resultados coinciden con los encontrados en Alemania (Westermann y col., 2010), en un estudio con 230 vacas positivas a EC, donde se detectaron diagnósticos falsos positivos de EC a la VG (con flujo purulento pero negativo a citología y/o bacteriología), con una prevalencia que osciló entre 17.3% y 28.5% según el punto de corte utilizado (5 ó 18% PMN). La cantidad de casos falsos positivos a la VG, aumentó más, cuando se utilizó para determinarlos, los resultados de la citología endometrial o de bacteriología por separado. En ese estudio, no se obtuvo aislamiento bacteriano en 19.6% de las muestras uterinas de animales con diagnóstico positivo a EC. De los aislamientos bacterianos logrados, en mono o doble cultivo, las especies bacterianas halladas fueron el *A.*

pyogenes (33.5%), *E. coli* (10.4%), SCN (41.7%) y *Streptococcus α -hemolítico* (SAH, 33.5%). (Westermann y col., 2010)

Por otro lado, se ha descrito al *H. Somnus* como el agente primario de vaginitis y de cervicitis mucopurulentas. En un estudio llevado a cabo por Campero y col., *H. somnus* fue el agente microbiano más comúnmente aislado de vacas con cervicitis, vaginitis, descarga vulvar mucopurulenta y repetición de celos (Campero y col., 1992). A diferencia del mencionado estudio, en este estudio no se aisló dicha bacteria.

Con respecto a la correlación entre la citología y el aislamiento bacteriano, Jeremejeva (Jeremejeva y col., 2010) halló en un estudio comparativo entre tratamientos de retención de membranas fetales, que el 35,7% de las muestras (20/56) con inflamación demostrable a la citología no presentaban aislamiento bacteriano. Ellos plantearon tres causas probables ante dicha falta de desarrollo bacteriano: una primera causa estaría relacionada con el método de la toma de las muestras bacteriológicas (biopsia uterina), planteando la posibilidad de que sea el método el que no permita el aislamiento en todas las muestras. Una segunda causa podría ser que la inflamación se presente una vez que los mecanismos de defensa del útero hayan controlado la colonización bacteriana, siendo entonces negativo el cultivo bacteriano. La última causa planteada, fue que la inflamación endometrial tenga una causa no estudiada como podría ser la fúngica (Jeremejeva y col., 2010). Otros autores han nombrado a las causas virales como al Herpesvirus Bovino (Bo-HV-4) como probables causantes de enfermedades uterinas (Sheldon y col., 2008).

Como podría esperarse, los aislamientos obtenidos en este experimento, no mostraron grandes diferencias entre los F1 y los F0. En ambos casos se aisló SCN el cual es clasificado según la bibliografía como un oportunista (Williams y col., 2005).

Los casos de ES no arrojaron ningún tipo de aislamiento; esto podría ser interpretado como que la ES no se encuentra relacionada con alguna infección bacteriana en particular. A nuestro parecer, si se hubieran logrado mayor número de muestras positivas a ES, probablemente se hubieran obtenido aislamientos similares a los encontrados para vacas negativas a ES, ya que en ese grupo la cantidad de animales muestreados fue mayor (6 vs. 38). Actualmente no existen informes que indiquen a alguna bacteria o grupo de ellas como causantes de ES.

Dentro de los aislamientos positivos, se presentó un solo caso de bacteria anaerobia, la cual no pertenece al grupo de patógenos uterinos descritos, sino que se encuentra enmarcada dentro de la clasificación de patógenos potenciales, pero que no están comúnmente asociados con lesiones uterinas. El SCN y el *Micrococcus spp* corresponden a un grado menor dentro de la clasificación de patogenicidad, ya que se los considera como contaminantes oportunistas aislados del útero y no asociados con endometritis. El SCN al igual que el SAH (no aislado en este estudio) han sido descritos como no patógenos, y su presencia disminuía el riesgo de EC (Westermann y col., 2010).

En un estudio llevado a cabo sólo con vacas con EC, se encontró mayor prevalencia de SCN y SAH en las vacas diagnosticadas con F1, a la inversa de lo encontrado en aquellas con F2 y F3 en las que prevaleció el aislamiento de *A. pyógenes*. (Westermann y col., 2010). En vacas positivas a SCN o a SAH, la proporción de muestras con porcentaje de PMN mayores al punto de corte, fue similar al encontrado en vacas sin crecimiento bacteriano, esto indicaría que esas bacterias no tienen ningún efecto sobre la respuesta inmune endometrial. (Westermann y col., 2010)

En los aislamientos de vacas con F2 y con conteos altos de PMN, predominó

ampliamente *A. pyógenes* (4/6). Se ha reportado que en los casos en los cuales *A. pyógenes* era el agente causal, la presencia de pus amarillento y flujo eran característicos (Campero y col., 1992). Es considerada como la bacteria más relevante en la patogénesis de las metritis, debido a su persistencia en el útero contaminado, amplia resistencia a los antibióticos y su sinergismo con bacterias anaeróbicas Gram negativas (Santos y col., 2010). El aislamiento de *A. pyógenes* se ha asociado con anormalidades histológicas importantes del útero de postparto incluyendo, piometritis, infiltración del endometrio con PMN, necrosis, abscesos y fibrosis periglandular. (Bonnett y col., 1991a). En estudios realizados, *A. pyógenes* fue negativamente correlacionado con conteos de células mononucleares y acúmulos linfocitos posiblemente como reflejo de la caída de la inmunocompetencia de la vaca y su efecto sobre la flora uterina. (Bonnett y col., 1991a)

A pesar de que EC puede ser causada por infecciones mixtas, los casos de endometritis severa se asocian particularmente con la presencia de *A. pyógenes* (Miller y col., 2007). El aislamiento de *A. pyógenes* en el periodo de involución tardío (28-35dpp), se encuentra asociado con una tasa de concepción disminuida (Huszenicza y col., 1999); esto concuerda con nuestros hallazgos, los que indican que la probabilidad de aislar *A. pyógenes* aumenta un 10% por cada aumento en 1% de PMN en la citología. Como fue explicado en el Capítulo IV, al aumentar el porcentaje de PMN, existe mayor probabilidad de que esa hembra sea diagnosticada con ES, aumentando la media de los días de vaca vacía.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que no existe relación entre ES y aislamiento bacteriano. Las bacterias encontradas en vacas clínicamente sanas corresponden a bacterias no patógenas uterinas, mientras que en vacas con flujos purulentos se encontró gran asociación con *A. pyógenes*, causa reconocida de lesiones uterinas.

CAPITULO VI

USO DE LA HISTEROSCOPIA PARA LA EVALUACION DE TECNICAS DIAGNOSTICAS DE ENDOMETRITIS CLINICA Y SUBCLINICA

INTRODUCCION

La endoscopia es un método habitual de diagnóstico utilizado en medicina humana, equina y de pequeños animales. En medicina bovina, si bien no es de uso común, han sido descritas varias aplicaciones de la misma (Franz, 2008). La endoscopia provee la oportunidad de tomar biopsias guiadas, como también la visualización de ciertas intervenciones quirúrgicas, como por ejemplo, el tratamiento del desplazamiento de abomaso o en la cirugía interna de pezón (Franz, 2008). En el área de reproducción bovina, la exploración endoscópica del útero, HI, puede ser una herramienta útil para la investigación; sin embargo, es raramente usada en la práctica veterinaria debido a que se requiere de un equipamiento específico y de alto costo, las evaluaciones son lentas, y para llevarlas a cabo se requiere entrenamiento previo (Mordak y col., 2007).

La técnica de HI aplicada a hembras bovinas ha sido descrita por pocos autores (Devine and Lindsay, 1984; Metzner y col., 1992). La técnica permite la visualización de cambios uterinos fisiológicos y/o patológicos ocurridos durante el periodo de postparto, y también la posibilidad de realizar tratamientos guiados (Franz, 2008; Mordak y col., 2007). Sumado a lo descripto, la HI podría ayudar a conocer la exactitud de las técnicas tradicionales de diagnóstico de EC como la VG y la PT, y también

permitiría evaluar nuevas técnicas de diagnóstico de ES como la citología endometrial, al permitir la toma de las muestras durante la visualización HI.

La comparación de las pruebas diagnósticas tradicionales con la HI, facilitaría cuantificar los diagnósticos erróneos que normalmente ocurren con dichas técnicas (PT, VG). Por ejemplo, la ocurrencia de casos de vaginitis, que normalmente complican y confunden el diagnóstico de endometritis clínica, posee probablemente una prevalencia mayor que la comunicada.

En resumen, la HI en los bovinos es una técnica que actualmente sólo es posible de aplicar en estudios de investigación; esto es debido principalmente a que se requiere un equipamiento de alto costo y un entrenamiento específico para su uso. La HI permite realizar seguimientos de cambios uterinos en el postparto, efectuar tratamientos guiados y evaluar distintas herramientas diagnósticas de trastornos uterinos. Los diagnósticos erróneos, falsos positivos de endometritis, conducen a tratamientos innecesarios de los animales y a interpretaciones erróneas de resultados de eficiencia reproductiva.

Con el propósito de ampliar los conocimientos en el diagnóstico de las patologías reproductivas del postparto, se realizó un experimento adicional al plan de tesis original. El mismo, se llevó a cabo entre junio y noviembre del 2008 en la Clínica de Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad Libre de Berlín y en un tambo comercial ubicado en la provincia de Brandeburgo, Alemania. La dirección del experimento fue en conjunto entre el Dr. de la Sota y el Dr. Drillich, este último docente e investigador en aquel momento de aquella institución.

El objetivo de este capítulo fue demostrar que la HI puede ser usada para evaluar métodos de diagnóstico de EC y ES en vacas de tambo.

Las principales hipótesis fueron las siguientes:

- La HI puede demostrar los diagnósticos falsos positivos de la VG y PT y determinar la prevalencia real de EC.
- La HI puede ser utilizada para el diagnóstico de ES debido a que permite la visualización directa de cambios sutiles de apariencia del endometrio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y animales

Para la realización del estudio se utilizaron hembras bovinas (*Bos taurus*) de raza Holstein Friesian propiedad del tambo estabulado comercial Ebereschenhof, ubicado en la provincia de Brandemburgo, Alemania; situada en un anillo rural de los alrededores de Berlín. Los animales se encontraban alojados bajo galpón con suelo de cama de paja.

El trabajo a campo se realizó entre julio y noviembre del 2008. Se utilizaron vacas (n=30) que se encontraban entre 20 y 35 dpp al momento del examen. Los animales incluidos en el experimento, debían tener una CC ≥ 2.5 , no haber padecido abortos, distocias ni retención de placenta en su último parto y encontrarse ciclando y en buen estado de salud general. Las vacas fueron ubicadas en un cepo de contención, con el fin de limitarles al máximo los movimientos durante el examen. No se les administró ningún tipo de sedante ni anestesia.

Las vacas incluídas en el estudio fueron examinadas en forma secuencial por VG, PT e HI. Previamente, se inspeccionaban externamente en busca de descargas vulvares; luego el área perineal era higienizada con abundante cantidad de toallas

descartables de papel. En primer lugar, se procedía a realizar la VG con un vaginoscopio de acero inoxidable estéril y con una fuente de iluminación externa. La parte anterior del vaginoscopio era rociada con solución salina estéril e introducido con suavidad en la vagina. La clasificación de los hallazgos se realizó según lo descrito por Sheldon (Sheldon y col., 2006); la evaluación de los flujos se realizó utilizando los mismos parámetros que en los experimentos anteriores, por lo que los F0 fueron clasificados como negativos a EC y los F1, F2 y F3 fueron clasificados como positivo a EC. Una vez finalizada la VG se comenzaba con la PT con el fin de evaluar el contenido de líquido dentro del útero, la simetría y tamaño de los cuernos y la presencia de estructuras ováricas palpables. Los datos recolectados por PT fueron clasificados como positivos cuando se encontraba presencia de fluido compatible con EC, asimetría cornual, posibilidad de retraer el útero a la pelvis, presencia de cuerpo lúteo o folículo palpable, o en su defecto como negativos.

La HI se realizó con un endoscopio rígido de 750 mm de largo y 6 mm de diámetro externo, específicamente desarrollado para su uso en bovinos por World of Medicine (Berlín, Alemania). El endoscopio era conectado a una cámara de video y una fuente de luz externa; internamente se encontraba equipado con dos canales, uno de los cuales fue usado para insuflar aire dentro de la luz uterina y el otro para la toma de muestras citológicas, Figura 6.1.

El endoscopio era introducido dentro de la vagina y desde ahí era guiado a través del cérvix por PT similar a las maniobras de la técnica de IA. En aquellas vacas en que era necesaria una previa dilatación del cérvix, se utilizó un dilatador metálico con punta elipsoide redondeado de 12 mm de diámetro, para permitir el posterior ingreso del endoscopio. Un operador manejaba el endoscopio desde la vagina guiándolo mediante

Figura 6.1. Fotos del histeroscopia utilizado en el estudio. A) endoscopio rígido (750 mm de largo, 6 mm de diámetro externo). B) equipo completo de HI (World of Medicine, Berlín, Alemania).

PT, mientras que un segundo operario era el responsable de la asistencia técnica ej., conexión de la cámara al endoscopio, control de la fuente de luz, registro de los hallazgos, etc.

Con el fin de mantener al endoscopio libre de mucus cervical, el mismo era protegido por una cobertura plástica descartable (Minitüb, Tiefenbach, Alemania). Luego que la porción anterior del endoscopio había superado el cérvix y alcanzado el cuerpo uterino, la cobertura plástica era rasgada y la cámara, la fuente de luz y la bomba de aire eran acopladas al endoscopio. Se comenzaba con el bombeo de aire dentro del útero hasta que la cavidad era lo suficientemente amplia como para permitir la visualización del endometrio; a partir de este momento un video digital era grabado para documentar los hallazgos.

En los casos en que el canal del aire del endoscopio era bloqueado por fluido intrauterino, o cuando el lente del endoscopio se ensuciaba dificultando la visualización, se utilizaba solución salina para limpiar los canales durante la exploración sin tener que interrumpirla (Devine and Lindsay, 1984).

La presencia de fluido dentro del útero, cicatrices y manchas rojas fueron documentadas y clasificadas como presencia positiva o negativa. La visualización de fluido mucopurulento o purulento en la luz uterina era considerado como signo indicativo de EC.

En 20 de las vacas inspeccionadas, no se encontraron descargas vaginales ni la presencia de pus a la HI; en ellas se tomaron muestras de citología endometrial por medio de un pequeño cepillo (Karl Storz Endoskop Austria, Viena, Austria) a través del canal del endoscopio diseñado específicamente para este fin. Luego del muestreo, el cepillo era rotado sobre la superficie de un portaobjetos, la muestra era fijada para

preservar la morfología celular y finalmente, en el laboratorio eran teñidas (LT-SYS, Labor und Technik, Berlín, Alemania). El porcentaje de PMN se determinaba sobre el conteo de un mínimo de 200 células totales; se usó como punto de corte el 5% de PMN como indicativo de ES (Gilbert y col., 2005).

Análisis estadístico

Los datos categóricos (presencia de fluido, simetría de los cuernos uterinos, color de mucosa uterina, presencia de puntos rojos, visualización de pus, etc.) fueron analizados con PROC CATMOD de SAS®. La sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y la exactitud fueron calculados usando el software Win Episcopo® 2.0. (Clive, College of Medicine and Veterinary Medicine, University of Edinburgh, UK).

RESULTADOS

De las 30 vacas examinadas se encontró que la prevalencia de EC diagnosticada por VG fue de 27% (8/30), por PT fue de 23% (7/30) y por HI fue de 13% (4/30). La HI no reveló diferencias significativas en la presencia de fluido entre vacas diagnosticadas a la VG como positivas y negativas a EC (75 vs. 43%, $P < 0.12$). Sin embargo, a la HI se visualizó pus sólo en vacas positivas pero no en vacas negativas a la VG (50 vs 0%, $P < 0.05$). Por otro lado, no se encontraron diferencias en los porcentajes de úteros retráctiles a la pelvis entre las vacas diagnosticadas positivas y negativas a la VG (75% vs. 86%; $P < 0.46$). Sin embargo, las vacas positivas a EC por VG tendieron a tener mayor asimetría cornual (75% vs. 41%; $P < 0.09$), y presentaron más líquido palpable dentro del

útero (50% vs. 14%; $P<0.04$). A la HI se encontraron manchas rojas en el endometrio en 33 y 6% de las vacas positivas y negativas a EC por VG, respectivamente ($P=0.08$), Figura 6.2.

Las características para las pruebas de diagnóstico como son la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y exactitud de PT y de VG fueron calculadas usando a la HI como método de oro para el diagnóstico de EC (Martin y col., 1987). Como fue explicado, un método de oro es una prueba o procedimiento absolutamente preciso en su diagnóstico aunque en la práctica, solo existen pocos verdaderos métodos de oro (Dohoo y col., 2003). En este estudio, la HI fue elegida como método de oro debido a que es el único método directo de evaluación del endometrio.

Las características de los test de diagnóstico (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y exactitud) para PT y VG comparados con HI son mostradas en la Tabla 6.1.

De aquellas vacas negativas a EC por VG y sin la presencia de pus visible en el útero, la prevalencia de ES diagnosticada por citología fue del 35% ($\geq 5\%$ PMN). Las anormalidades del endometrio encontradas en vacas con EC como el color rojizo de la mucosa, la presencia de puntos rojos y cicatrices, no fueron encontradas en vacas positivas ni en las negativas a ES; además todas las vacas de ambos grupos mostraron fluido claro y ausencia de pus dentro del útero. Al analizar los datos utilizando esta vez al CB como método de oro para el diagnóstico de ES, se encontró que la HI presenta muy baja sensibilidad (11%) aunque alta especificidad (92%) para el diagnóstico de ES, Tabla 6.2.

Figura 6.2. Imágenes obtenidas con el endoscopio rígido utilizado en el estudio. A) endometrio sin alteraciones luego de finalizado el puerperio clínico (>21 dpp), B) endometrio con alteraciones (>21 dpp) y C) endometrio de un animal en puerperio temprano (primer semana postparto).

Tabla 6.1. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo, y exactitud de la PT y la VG comparado con la HI usada como estándar de oro para el diagnóstico de EC (n=30).

Características del Test	PT % (IC 95%)	VG % (IC 95%)
Sensibilidad ¹	75 (30-95)	100 (51-100)
Especificidad ²	85 (66-94)	85 (66-94)
Valor Predictivo Positivo ³	43 (16-75)	50 (22-78)
Valor Predictivo Negativo ⁴	96 (79-99)	100 (85-100)
Exactitud ⁵	83 (74-89)	86 (70-94)

¹Sensibilidad: número de vacas diagnosticadas con EC /número total de vacas con EC (método de oro),

²Especificidad: numero de vacas diagnosticadas como libres de EC/ número total de vacas libres de EC (método de oro),

³Valor Predictivo Positivo: número de vacas diagnosticadas positivas a EC correctamente/ número total de vacas diagnosticadas con EC,

⁴Valor Predictivo Negativo: número de vacas diagnosticadas libres de EC correctamente /número total de vacas diagnosticadas como libres de EC,

⁵ Exactitud: número de vacas diagnosticadas correctamente (positivas o negativas) / número total de vacas,

IC 95%: intervalo de confianza del 95%.

Tabla 6.2. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y eficiencia del CB para el diagnóstico de ES (n=22).

	Histeroscopia %
Sensibilidad	11
Especificidad	92
Valor predictivo positivo	50
Valor predictivo negativo	59
Exactitud	59

DISCUSION

La técnica de HI en sí, fue bien tolerada en las vacas evaluadas, como también había sido comunicado anteriormente (Devine and Lindsay, 1984; Metzner y col., 1992). Los datos obtenidos en este estudio dan la primera evidencia de que la HI puede ser usada para determinar la exactitud de la PT y de la VG para su uso en el diagnóstico de EC.

La prevalencia de EC encontrada por VG fue 14% superior que la encontrada por HI, sugiriendo que ese 14% correspondería a fallas del diagnóstico. Si se toma a la HI como método de oro, ese 14% correspondería a la presencia probables de vaginitis que confunden el diagnóstico generando falsos positivos a EC. Esto concuerda con datos informados por Westermann en donde se encontró que un 17% de los casos de EC (positivos a la evaluación vaginoscópica) eran negativos a aislamiento bacteriano y a la citología endometrial (punto de corte 5% PMN; (Westermann y col., 2010). Coincidiendo además con estos hallazgos, se encuentran los datos del Capítulo V en los que dentro de aquellos animales diagnosticados con EC, se encontró que 28,5% (2/7) de F1 y 33,3% (3/9) de F2 presentaban conteos muy bajos de PMN a la citología, siendo incluso menores a los necesarios para dar como positiva la muestra a ES. Esto podría indicar que el contenido purulento observado en la vagina era debido a casos de vaginitis y no a casos de endometritis por lo que el útero, en estos animales, no se encontraba afectado.

Cuando la HI fue usada como método de oro, la VG y la PT mostraron similares características (valor predictivo positivo del 50 y 43%, exactitud del 86 y 83%); lo que indica que para ambas técnicas diagnósticas, la ocurrencia de resultados falsos positivos para el diagnóstico de EC.

El examen del útero con endoscopio rígido no permite la exploración del útero en su totalidad, quedando limitada al cuerpo y a la parte caudal de los cuernos. Debido a esto, existe la posibilidad de que aquellos animales que presenten contenido purulento sólo en craneal a la curvatura mayor uterina, no puedan ser detectados con el endoscopio rígido.

Con respecto al diagnóstico de ES, la HI parece ser de uso limitado, ya que no se han observado cambios que nos permitan distinguir entre vacas con y sin ES; esto se ve reflejado en la baja sensibilidad que mostró la HI para el diagnóstico de ES al ser comparado con CB. Igualmente, más allá de los resultados y tomando en consideración el limitado número de observaciones, cabe pensar que quizás la HI pueda llegar a ser, luego de un mejoramiento de la técnica descrita, un método confiable de diagnóstico de ES. Para futuros estudios, la técnica podría ser mejorada para permitir la exploración del útero hasta su parte más anterior. La HI podría ser de mucha utilidad para la validación de la técnica de CB, permitiendo la toma de muestra de las citologías de diferentes áreas del endometrio para su comparación, como por ejemplo muestras de zonas glandulares y de carúnculas.

CONCLUSIONES

En resumen, HI mostró ser una técnica eficiente para el diagnóstico de EC, pero ineficiente para el diagnóstico de ES.

POSIBLES APLICACIONES DE LA HISTEROSCOPIA EN EL FUTURO

La HI bovina puede ser muy útil para el diagnóstico e investigación como fue explicado más arriba, sin embargo la implementación de la técnica presenta ciertas dificultades. En general, el desafío más importante es lograr atravesar el cérvix con el endoscopio en vacas con el cérvix no dilatado. Además, en muchos casos es muy difícil mantener la imagen en la pantalla cuando el animal realiza movimientos, por mínimos que fueran.

Con el objeto de mejorar el examen HI algunos cambios en la técnica deberían ser probados por ejemplo, usando solución salina en lugar de aire para expandir las paredes del útero. Probablemente al utilizar un líquido, los movimientos del útero podrían ser menores y de esta manera la imagen obtenida, sería de calidad superior. En medicina humana, se utiliza solución salina 0.9%; sin embargo en medicina bovina esto no ha sido descrito aún. Otra opción podría ser mediante la insuflación con presión de gas CO₂ (Metzner y col., 1992).

En los estudios publicados se han utilizado tanto endoscopios rígidos como flexibles (Mordak y col., 2007) (Devine and Lindsay, 1984) (Metzner y col., 1992). La principal desventaja del endoscopio flexible es la dificultad que se genera al tratar de introducirlo a través del cérvix, lo que llega a ser casi imposible en los momentos del ciclo en los que el cérvix se encuentra cerrado (diestro). Por otro lado, su principal ventaja es que permite la exploración profunda del útero y que minimiza la posibilidad de generar lesiones durante la exploración. En contraste con el endoscopio flexible, el rígido permite su pasaje a través del cérvix en cualquier etapa del ciclo (Metzner y col., 1992); también se cita el menor riesgo de contaminación bacteriana durante el examen ya que es manipulado desde el recto; (Metzner y col., 1992). Como desventaja se hace

referencia a la imposibilidad de explorar los cuernos uterinos más allá del tercio medio del útero y el riesgo potencial de generar injurias en la mucosa es mayor que con un endoscopio flexible. En el caso del endoscopio flexible, el uso de un vástago podría facilitar el pasaje a través del canal cervical y resolver de esta manera, el principal inconveniente que presenta.

A pesar de todas las ventajas que ofrece la HI, no es probable de que en un período corto de tiempo sea usado en la práctica veterinaria diaria. La técnica requiere tiempo, equipamiento costoso y entrenamiento previo. En investigación, sin embargo, HI puede tener distintas aplicaciones. En todo los casos, las imágenes endoscópicas deberían ser interpretadas en conjunto con los resultados del examen físico (Franz, 2008). Estos son algunos ejemplos:

- Estudiar procesos fisiológicos como la involución uterina (Metzner y col., 1992)
- Comparar diferentes técnicas de diagnóstico de patologías uterinas
- Comparar muestras de diferentes zonas uterinas (carúnculas, zonas glandulares, etc.) a través del muestreo guiado por visualización (citologías, bacteriología)
- Seguimiento de investigaciones en tratamientos intrauterinos
- Diagnóstico de vacas infértiles con alto valor económico

CONCLUSIONES GENERALES

Esta tesis tuvo cinco objetivos principales: 1) conocer el grado de asociación entre los resultados del grado de inflamación subclínica obtenidos mediante la técnica del CB y los cambios en la histología uterina mediante la evaluación de BU; 2) estudiar las variaciones fisiológicas del porcentaje de PMN en el endometrio durante el ciclo estral por medio de la técnica de CB; 3) validar la técnica de CB en nuestro país y determinar la prevalencia de ES y los niveles de corte del porcentaje PMN que se correspondan con una disminución de la eficiencia reproductiva; 4) determinar los agentes bacterianos involucrados en la ES; y 5) demostrar que la HI puede ser usada para evaluar métodos de diagnóstico de EC y ES en vacas de tambo. Para cumplir con estos cinco objetivos se realizaron cinco experimentos.

En el primer experimento, se estudió la correlación entre los cambios en la histología uterina mediante la evaluación de BU y los resultados del grado de inflamación subclínica obtenidos mediante la técnica del CB; no se encontró clara asociación entre los hallazgos histopatológicos y el diagnóstico citológico de inflamación uterina.

En el segundo experimento, se estudiaron las variaciones fisiológicas del porcentaje de PMN en la citología endometrial durante el ciclo estral mediante la técnica del CB, y se demostró que el porcentaje de PMN no varían a lo largo del ciclo estral en vacas normales sin EC, y que por lo tanto el diagnóstico de ES por la técnica de CB refleja los cambios inflamatorios que ocurren en el endometrio.

En el tercer experimento, se validó por primera vez la técnica de CB en nuestro país y se determinaron los niveles de corte que se corresponden con una disminución de la eficiencia reproductiva. La prevalencia de ES diagnosticada por CB, en vacas de tambo bajo sistema de producción pastoril fue del 17%. Las vacas con ES tuvieron 16,2% de reducción en la tasa de concepción al primer servicio, 16,8% de disminución en la cantidad de vacas preñadas a los 100 días de lactancia y 29 días más de días abiertos comparado todo con vacas sin ES. Además, se identificaron como puntos de cortes a $\geq 8\%$ de PMN para el INT de 21-33dpp, $\geq 6\%$ de PMN para el INT de 34-47dpp, $\geq 4\%$ de PMN para el INT de 48-62dpp, y $\geq 5\%$ para el INT de 21-62 dpp para el diagnóstico de ES por la técnica de CB.

En el cuarto experimento, se determinaron los agentes bacterianos involucrados en la ES. Los resultados de este estudio indicaron que no existe relación entre ES y aislamiento bacteriano. Las bacterias encontradas en vacas clínicamente sanas corresponden a bacterias no patógenas uterinas, mientras que en las vacas con flujos purulentos se encontró gran asociación con *A. pyógenes*, reconocido causante de lesiones uterinas.

En el quinto experimento, se evaluó si la HI podía ser utilizada para evaluar métodos de diagnóstico de EC y ES en vacas de tambo, y se demostró que la HI es una técnica eficiente para el diagnóstico de EC pero ineficiente para el diagnóstico de ES.

En conclusión, se validó por primera vez en nuestro país la técnica del CB para realizar el diagnóstico de ES, y se determinaron los puntos de corte del porcentaje de PMN para diagnosticar a campo la prevalencia de ES. Durante el ciclo estral, el porcentaje de PMN nunca superó el 2% de PMN, mientras que con porcentajes de PMN superiores al 8%, 6%, 4% y 5% a los 21-33, 34 a 47, 48 a 62 y 21 a 62 dpp se comienza a observar una disminución de la eficiencia reproductiva. De hecho este ha sido el primer trabajo en nuestro país en demostrar que las vacas con ES tuvieron 16.2% de reducción en la tasa de concepción al primer servicio, 16.8% de reducción en la cantidad de vacas preñadas a los 100 días de lactancia y 29 días más de días abiertos comparado todo con vacas sin ES. Otro hallazgo importante de este trabajo fue que no existe relación entre ES y aislamiento bacteriano. Por último, se demostró que la HI es una técnica eficiente para el diagnóstico de EC pero ineficiente para el diagnóstico de ES.

BIBLIOGRAFÍA

- Allison, P., 1995, *Survival Analysis Using SAS: A practical guide*, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Allison, P., 1999, *Logistic Regression Using SA: Theory and applications*, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Asdell, S.A., 1955, The estrous cycle, In: *Cattle fertility and sterility*. pp. 61-71.
- Azawi, O.I., 2008, Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci* 105, 187-208.
- Azawi, O.I., Omran, S.N., Hadad, J.J., 2008, A study of endometritis causing repeat breeding of cycling iraqi buffalo cows. *Reprod Domest Anim* 43, 735-743.
- Bargo, F., Busso, F., Corbellini, C., Grigera, J., Lucas, V., Podetti, V., Tuñón, G., Vidaurreta, I., 2009, Organización y análisis de un sistema de registro de enfermedades del periparto en vacas lecheras: su incidencia e impacto económico sobre las empresas.
<http://www.infortambo.com.ar/admin/upload/arch/Claves%20I%20reporte%20final.pdf>
- 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.
- Baron, E.J., Weissfeld, A., Fuselie, P., Brenner, D., 1995, Classification and identification of bacteria, In: Murray, P. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology*. ASM PRESS, Washington DC, pp. 249-264.
- Bonafos, L.D., Kot, K., Ginther, O.J., 1995, Physical characteristics of the uterus during the bovine estrous cycle and early pregnancy. *Theriogenology* 43, 713-721.
- Bondurant, R.H., 1999, Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci* 77 Suppl 2, 101-110.
- Bonnet, B., Miller, R., Etherington, W., Martin, S., Johnson, W., 1991, Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows I. *Can J Vet* 55, 155-161.
- Bonnett, B.N., Martin, S.W., Gannon, V.P., Miller, R.B., Etherington, W.G., 1991a, Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res* 55, 168-173.
- Bonnett, B.N., Miller, R.B., Etherington, W.G., Martin, S.W., Johnson, W.H., 1991b, Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Can J Vet Res* 55, 155-161.
- Bonnett, B.N., Wayne Martin, S., Meek, A.H., 1993, Associations of clinical findings, bacteriological and histological results of endometrial biopsy with reproductive performance of postpartum dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 15, 205-220.
- Buergelt, C., 1997, Diseases of the female reproductive tract, In: Mosby (Ed.) *Color atlas of reproductive pathology of domestic animals*. p. 128.
- Campero, C., Conosciuto, G., Odriozola, E., Moreira, A., Lodeiro, R., Boissou, R.G., Hernainz, R., 1992, Hallazgos clínicos bacteriológicos e histopatológicos en vacas lecheras asociados con problemas reproductivos. *Rev Méd Vet* 73, 264-272.

- Capitaine Funes, A., 2005. Factores que afectan la tasa de preñez en rodeos lecheros en Argentina. In: VI Simposio internacional de reproducción animal (IRAC), Córdoba, Argentina, pp. 179-196.
- Cary, N. 1990. SAS/STAT user's guide (SAS Inst. Inc.).
- Claver, J., Sanchez, A., Sicardi, A., 1987, Aparato reproductor femenino comparado, In: Sur, H. (Ed.) Lecciones de histología veterinaria. Histología y Embriología FCV, UBA, Buenos Aires.
- Cobb, S.P., Watson, E.D., 1995, Immunohistochemical study of immune cells in the bovine endometrium at different stages of the oestrous cycle. *Res Vet Sci* 59, 238-241.
- Constantin, A., Meissonnier, E., 1981, L'uterus de la vache : anatomie, physiologie, pathologie. Societé Française de Buiatrie, Maisons-Alfort (Paris), 355 p. p.
- Corbellini, C., Busso, F., Grigera, J., Tuñon, G., 2008, Las enfermedades de base metabolico-nutricional en las vacas lecheras en transición. IDIA XXI, INTA.
- Correa, M.T., Erb, H., Scarlett, J., 1993, Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. *J Dairy Sci* 76, 1305-1312.
- 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.
- Chapwanya, A., Meade, K.G., Narciandi, F., Stanley, P., Mee, J.F., Doherty, M.L., Callanan, J.J., O'Farrelly, C., 2010, Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenology* 73, 988-994.
- Dellmann, D., Brown, E., 1993, Sistema Reproductor Femenino, In: Acribia (Ed.) *Histología Veterinaria* Zaragoza.
- Devine, D.A., Lindsay, F.E., 1984, Hysteroscopy in the cow using a flexible fibrescope. *Vet Rec* 115, 627-628.
- Dhaliwal, G.S., Murray, R.D., Woldehiwet, Z., 2001, Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim Reprod Sci* 67, 135-152.
- Dijkhuizen, A.A., Stelwagen, J., Renkema, J.A., 1985, Economic aspects of reproductive failure in dairy cattle. I. Financial loss at farm level. *Preventive Veterinary Medicine* 3, 251-263.
- Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2003, Veterinary epidemiology research. University of Prince Edward Island, Canada.
- Dominguez, G., Magnasco, M., Magnasco, R., Hernandez, J., Risco, C., de la Sota, R., 2006, Effect of clinical endometritis on reproductive performance in Holstein cows in Argentina. *Theriogenology* 66, 679-680.
- Domínguez, G., Magnasco, R., Magnasco, M., de la Sota, R., 2003. Diagnóstico, tratamiento y autocura de infecciones uterinas en un rodeo lechero bajo condiciones de explotación comercial. In: V Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, p. 394.
- Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., Webster, G., 1989 A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *J Dairy Sci* 72, 68-78.
- Erb, H.N., Smith, R.D., Hillman, R.B., Powers, P.A., Smith, M.C., White, M.E., Pearson, E.G., 1984, Rates of diagnosis of six diseases of Holstein cows during

- 15-day and 21-day intervals. American journal of veterinary research 45, 333-335.
- Erb, H.N., Smith, R.D., Oltenacu, P.A., Guard, C.L., Hillman, R.B., Powers, P.A., Smith, M.C., White, M.E., 1985, Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *J Dairy Sci* 68, 3337-3349.
- Farin, P.W., Ball, L., Olson, J.D., Mortimer, R.G., Jones, R.L., Adney, W.S., McChesney, A.E., 1989, Effect of *Actinomyces pyogenes* and gram-negative anaerobic bacteria on the development of bovine pyometra. *Theriogenology* 31, 979-989.
- Feresin, F., Chesta, P., Bó, G., 2006. Prevalencia de endometritis bovina en vacas lecheras argentinas. In: *Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos*, Córdoba, Argentina.
- Földi, J., Kulcsar, M., Pecs, A., Huyghe, B., de Sa, C., Lohuis, J.A., Cox, P., Huszenicza, G., 2006, Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Anim Reprod Sci* 96, 265-281.
- Forde, N., Beltman, M.E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J.F., Crowe, M.A., 2011, Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Anim Reprod Sci* 124, 163-169.
- Fourichon, C., Seegers, H., Malher, X., 2000, Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 53, 1729-1759.
- Franz, S., 2008. Importance of endoscopic techniques for diagnosis and therapy in ruminants. In: *XVV Jubilee World Buiatrics Congress*, Budapest, pp. 33-35.
- Galvão, K., Frajblat, M., Brittin, S., Butler, W., Guard, C., Gilbert, R., 2009 Effect of prostaglandin F2 α on subclinical endometritis and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92, 4906-4913.
- Galvão, K.N., Flaminio, M.J.B.F., Brittin, S.B., Sper, R., Fraga, M., Caixeta, L., Ricci, A., Guard, C.L., Butler, W.R., Gilbert, R.O., 2010, Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93, 2926-2937.
- Galvão, K.N., Santosa, N.R., Galvão, J.S., Gilbert, R.O., 2011, Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. *Theriogenology* 76, 290-299.
- Gilbert, R.O., 2005, Endometritis subclínica en vacas lecheras. *Taurus* 28, 5.
- Gilbert, R.O., Shin, S.T., Guard, C.L., Erb, H., 1998, Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 49, 1.
- 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.
- Gröhn, Y., Erb, H.N., McCulloch, C.E., Saloniemi, H.S., 1990, Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. *Preventive Veterinary Medicine* 8, 25-39.
- 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.
- Hansel, W., 1959, The estrous cycle of the cow, In: *Cole and Cupps (Ed.) Reproduction in domestic animals*. New York, pp. 235-238.
- Hansel, W., Convey, E.M., 1983, Physiology of the estrous cycle. *J Anim Sci* 57 Suppl 2, 404-424.

- Huszenicza, G., Fodor, M., Gacs, M., Kulcsar, M., Dohmen, M., Vamos, M., Porkolab, L., Kegl, T., Bartyik, J., Lohuis, J., Janosi, S., Szita, G., 1999, Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 237-245.
- Jeremejeva, J., Orro, T., Valdmann, M., Kask, K., 2010, Bacteriological and cytological findings during the late puerperal period after two different treatments of retained placenta followed by acute puerperal metritis. *Acta Vet Scand* 52, 41.
- Jones, T., Hunt, R., 1997, *Patología veterinaria*. Hemisferio Sur, Buenos Aires.
- 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.
- Kenney, R.M., 1978, Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc* 172, 241-262.
- Kojima, Y., Selander, U., 1969, Cyclical changes in the fine structure of bovine endometrial gland cells *Cell and Tissue Research* 104 69-86.
- Laven, R.A., Biggadike, H.J., Proven, M.J., Halfacre, S., Tickle, L.R., 2000, Changes in vaginal microbiology associated with the use of progesterone-releasing intravaginal devices. *The Veterinary record* 146, 760-762.
- 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.
- Lenz, M., Drillich, M., Heuwieser, W., 2007, [Evaluation of the diagnosis of subclinical endometritis in dairy cattle using ultrasound]. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 120, 237-244.
- Madoz, L., Ploentzke, J., Albarracin, D., Mejia, M., Drillich, M., Heuwieser, W., De la Sota, R., 2008, Prevalence of clinical and subclinical endometritis in dairy cows and the impact on reproductive performance. *Reprod. Domest. Anim. Supplem.* 43 51.
- Madoz, L., Ploentzke, J., Dominguez, G., Jaureguiberry, M., Suzuki, K., Drillich, M., Heuwieser, W., De la Sota, R., 2010. Effect of subclinical endometritis on reproductive performance in dairy cows in Argentina. In: XXVI World Buiatrics Congress, Santiago, Chile.
- Magnasco, M., Magnasco, R., DeLaSota, R.L., 2007. Prevalencia de endometritis clínica en un tambo comercial y su efecto sobre la eficiencia reproductiva. In: VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, p. 302.
- Martin, S., Meek, A., Willeberg, P., 1987, *Veterinary Epidemiology. Principle and Methods*, In: Iowa State Univ Pr Iowa, pp. 343-354.

- 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.
- Messier, S., Higgins, R., Couture, Y., Morin, M., 1984, Comparison of swabbing and biopsy for studying the flora of the bovine uterus. *Can Vet J* 25, 283-288.
- Metzner, M., Lessmann, H.W., Merck, C.C., 1992, [Hysteroscopy as a diagnostic aid for uterine diseases of cattle]. *Tierarztl Prax* 20, 364-367.
- Miller, A., Williams, E., Sibley, K., Herath, S., Lane, E., Fishwick, J., Nash, D., Rycroft, A., Dobson, H., Bryant, C., Sheldon, I., 2007, The effects of *A. pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology* 68, 972-980.
- Mordak, R., Kubiak, K., Jankowski, M., Nicpon, J., 2007, Hysteroscopy in cows-picture of postparturient metritis. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 10.
- Noakes, D., Parkinson, T., England, G., 2001, Infertility in the cow, In: *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. pp. 399-406.
- Noakes, D.E., Till, D., Smith, G.R., 1989, Bovine uterine flora post partum: a comparison of swabbing and biopsy. *The Veterinary record* 124, 563-564.
- Noakes, D.E., Wallace, L., Smith, G.R., 1991, Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *The Veterinary record* 128, 440-442.
- Ohtani, S., Okuda, K., Nishimura, K., Mohril, S., 1993, Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle *Theriogenology* 39, 1033-I 1042.
- Olson, J.D., Ball, L., Mortimer, R.G., Farin, P.W., Adney, W.S., Huffman, E.M., 1984, Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. *American journal of veterinary research* 45, 2251-2255.
- Palmer, C., 2006. Endometritis en vacas de leche. In: *Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos*, Córdoba, Argentina.
- Perusia, O., Peralta, C., Repetto, A., Signorini, M., Iniguez, E., 1998, Biopsias endometriales en bovinos. *Therios: Revista de medicina veterinaria y produccion animal* 27, 118-124.
- Petit, T., Spengler, J., Rosengarten, R., Aurich, J., 2009, Prevalence of Potentially Pathogenic Bacteria as Genital Pathogens in Dairy Cattle. *Reprod Dom Anim* 44, 88-91.
- Plontzke, 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.
- Pursley, J.R., Wiltbank, M.C., Stevenson, J.S., Ottobre, J.S., Garverick, H.A., Anderson, L.L., 1997, Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci* 80, 295-300.
- Raab, D., Drillich, M., Heuwieser, W., 2003. Diagnosis of subclinical endometritis and its effect on reproductive performance. In: *36th Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners*, Columbus, Ohio, USA, p. 166.

- Raab, D., Drillich, M., Heuwiesser, W., 2004. Diagnosis of subclinical endometritis and its effects on reproductive performance. In: 36th Annual Conference of the AABP, Columbus, Ohio. USA. , p. 166.
- Ruder, C., Sasser, R., Williams, R., Ely, J., Bull, R., Butler, J., 1981, Uterine infections in the postpartum cow II. Possible synergistic effect of *Fusobacterium necrophorum* and *Corynebacterium pyogenes*. *Theriogenology* 15, 573-580.
- Rutter, B., Russo, A., Capdevielle, E., 1999, Aislamientos bacterianos en hembras bovinas lecheras con partos normales y asistidos con distintos trastornos puerperales. *Vet Arg XVI*, 731-379.
- SADABEC, 1995, Guía Práctica para el procesamiento de muestras clínicas. Subcomisión Anaerobios-División Asociación Argentina de Microbiología. .
- 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.
- Santos, T.M., Caixeta, L.S., Machado, V.S., Rauf, A.K., Gilbert, R.O., Bicalho, R.C., 2010, Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows. *Vet Microbiol* 145, 84-89.
- SAS, 2003, SAS and STAT Users Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc. . Cary, NC, USA.
- SAS 2009. Inter-Rater Reliability/KAPPA using SAS PROC FREQ.
- SAS 2011. SAS/STAT(R) 9.2 User's Guide, Second Edition. The GENMOD Procedure.
- Sheldon, I.M., Dobson, H., 2004, Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 82-83, 295-306.
- 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., Dobson, H., 2002, Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet Rec* 151, 531-534.
- Sheldon, I.M., Williams, E.J., Miller, A.N., Nash, D.M., Herath, S., 2008, Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* 176, 115-121.
- Studer, E., Morrow, D., 1978a, Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172, 489-494.
- Studer, E., Morrow, D., 1980, Uterine cultures and histological evaluation as complements to routine postpartum examinations, In: Saunders (Ed.) *Current therapy in theriogenology*. Philadelphia, pp. 223-226.
- Studer, E., Morrow, D.A., 1978b, Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172, 489-494.
- Thrusfield, M., 2007, *Veterinary epidemiology*, 3rd Edition. Blackwell Science, Oxford [etc.], 610 p. p.
- Trigo Tavera, F.J., 1998, *Patología sistemática veterinaria*, 3ª Edition. McGraw-Hill Interamericana, México, 421 p. p.
- Westermann, S., Drillich, M., Kaufmann, T.B., Madoz, L.V., Heuwiesser, W., 2010, A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by

- vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology* 74, 1248-1255.
- Williams, E.J., Fischer, D.P., Pfeiffer, D.U., England, G.C., Noakes, D.E., Dobson, H., Sheldon, I.M., 2005, Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63, 102-117.
- Wolfinger, R., Chang, M., 1995. Comparing the SAS GLM and MIXED Procedures for Repeated Measurements Analysis. In: *SUGI Proceedings*.
- Zemjanis, R., 1973, *Reproducción animal : diagnóstico y técnicas terapéuticas*, [reimp.] Edition. Limusa-Wiley, México, 253 p. p.

BIOGRAFIA PERSONAL

La Médica Veterinaria, Laura Vanina Madoz nació en la ciudad de Neuquén capital, el 15 de septiembre de 1978. Realizó sus estudios secundarios en la Escuela Provincial de Educación Agropecuaria (EPEA N°2) ubicada en la localidad de Plottier, recibiendo el título de Técnica agropecuaria con orientación en producción animal en el año 1997. Ingresó a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata en 1998 y obtuvo el título de Médica Veterinaria el 27 de mayo del 2005. Recibió la distinción Joaquín V. González otorgada por la Municipalidad de la Plata a los mejores promedios egresados de Universidad Nacional de La Plata.

Fue Ayudante Alumna en la Cátedra de Fisiología entre 2001 y 2006. En marzo de 2005 ingresó a la Cátedra de Reproducción Animal como Ayudante Alumna en el área de bovinos, y luego a partir de su graduación pasó a ser auxiliar diplomado *ad-honorem* hasta el año 2008 en que concursó por el cargo de Auxiliar Diplomada Rentada, cargo que obtuvo y que desempeña en la actualidad.

En el año 2005 fue becada por concurso de la Agencia de Cooperación Internacional de Japón-JICA para realizar un curso de entrenamiento de tres meses en la Facultad de Veterinaria y Agronomía de Obihiro, Japón sobre “Producción lechera sustentable y técnicas relacionadas”. Más tarde, se le otorgó una beca de Iniciación de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires-CIC para comenzar sus estudios de postgrado los cuales pudo continuar con la obtención de una beca de postgrado Tipo I y una de Tipo II del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas -CONICET para realizar su trabajo de tesis doctoral.

En 2007, comenzó a participar en los proyectos de investigación del Programa de Incentivos y en el 2010 fue categorizada como docente-investigador categoría V.

En el año 2008 fue becada por el Servicio Alemán de Intercambio Académico-DAAD con una beca para jóvenes investigadores. La misma le permitió realizar una pasantía de investigación en la Clínica de Reproducción de Rumiantes de la Universidad Libre de Berlín durante seis meses en el uso de histeroscopia para el diagnóstico de endometritis clínica y subclínica en bovinos. Durante dicho período llevó a cabo el quinto experimento de esta tesis, bajo la dirección del Dr. Marc Drillich.

Una vez finalizada esta tesis, continuará con su labor de investigación en la Cátedra y el Servicio de Reproducción, con una beca de Post Doctorado de CONICET por dos años realizando un estudio en la expresión de transcritos endometriales involucrados en la subfertilidad de vacas repetidoras con endometritis subclínica.