



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
VETERINARIA**

Evaluación y comparación de tres métodos para el diagnóstico de endometritis subclínica en vacuno lechero

Alumna: Patricia Carulla Pascual

Tutor: Juan Carlos Gardón Poggi

Curso académico: 2018-2019



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

Agradecimientos

En primer lugar, mi más profundo agradecimiento a mi familia, a mis padres, a mis hermanas Mónica y Esther y a mis cuñados, por haber sido mis pilares durante toda la carrera y más, si cabe, en la recta final de ésta. Desde que me embarqué en el camino de la veterinaria siempre han sido un apoyo fundamental que, sin ellos, esto no habría sido posible.

A Maikel, por estar a mi lado cada día, apoyándome a seguir hacia delante y no decaer. Por las palabras de ánimo, los silencios de comprensión y por ayudarme a despejarme en los días más duros.

A las amigas que me ha dado esta carrera, en especial Paula y Elena, por haber estado estos 5 años juntas, apoyándonos unas a las otras para seguir. Hemos compartido muchos momentos, muchas risas, lloros y enfados pero que, sin ellas, todo este viaje no habría sido lo mismo. A Belem, no solo por compartir conmigo el amor por la veterinaria sino por compartir afición y por estar siempre ahí.

A mis amigas de la infancia, Marta y Ana Belén, por esas conversaciones y esos momentos para despejarse. Por tener siempre una palabra de ánimo, un consejo y sobretodo un abrazo en los momentos más difíciles.

A los profesores que he tenido durante la carrera, por sus enseñanzas, prácticas y consejos.

A mis tutores, Juan Carlos y Giovanni, por sus enseñanzas, guía durante el desarrollo del trabajo y por ayudarme en la toma de muestras. A Arantxa por su ayuda con los análisis estadísticos.

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción y revisión bibliográfica	3
1.1. Postparto e involución uterina	4
1.2. Definiciones de enfermedades uterinas.....	5
1.3. Endometritis subclínica.....	5
1.4. Técnicas de diagnóstico de endometritis subclínica.....	8
1.4.1. Videoendoscopia y vaginoscopia.....	10
1.4.2. Ultrasonografía uterina	10
1.4.3. Citología endometrial	12
2. Objetivos	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Localización del establecimiento	15
3.2. Características del alojamiento y manejo nutricional	15
3.3. Manejo reproductivo y sanitario	15
3.4. Selección de animales incluidos en el estudio	16
3.5. Herramientas de diagnóstico.....	16
3.5.1. Videoendoscopia	16
3.5.2. Ultrasonido	17
3.5.3. Citología endometrial	18
3.6. Evaluación de los resultados.....	22
3.6.1. Antecedentes reproductivos	22
3.6.2. Prevalencia de endometritis subclínica.....	22
3.6.3. Herramientas diagnósticas y antecedentes reproductivos.....	22
4. Resultados	22
4.1. Antecedentes reproductivos.....	22
4.2. Prevalencia de endometritis subclínica	24
4.3. Resultado pruebas diagnósticas	24
4.4. Asociación entre los distintos métodos utilizados para el diagnóstico de endometritis subclínica	28
4.5. Asociación de los antecedentes reproductivos con el diagnóstico de endometritis subclínica	29
5. Discusión	30
6. Conclusiones.....	35
7. Bibliografía	36

Resumen

La endometritis subclínica (ES) se ha definido como la inflamación del endometrio con ausencia de signos clínicos. Los objetivos del presente estudio fueron 1: estudiar la prevalencia de la ES; 2: evaluar y comparar dos métodos diagnósticos con la citología; y 3: evaluar la asociación de los antecedentes reproductivos con ES. Fueron utilizadas 30 vacas entre 31 y 61 días postparto (DPP). Los métodos de diagnóstico fueron: videoendoscopia de la porción caudal del tracto reproductor (orificio uterino externo); ultrasonografía de los cuernos uterinos y ovarios y citología endometrial mediante cepillo endocervical ginecológico. El criterio de positividad fue: para videoendoscopia la secreción, inflamación y apertura del cérvix; para ultrasonografía el grosor del endometrio >8 mm (GE) y diámetro del lumen uterino >3mm (LU); y para citología endometrial el porcentaje de polimorfonucleados neutrófilos $\geq 8\%$ a 21-23 DPP, $\geq 6\%$ a 34-47 DPP, $\geq 4\%$ a 48-62 DPP. Los resultados se evaluaron con la prueba exacta de Fisher. La prevalencia de ES en el grupo de animales estudiados fue del 53,3%. La ultrasonografía y la videoendoscopia no estaban relacionadas con la citología. Sin embargo, analizando las variables ecográficas por separado, hubo asociación con la citología (GE $p=0,05$, LU $p=0,03$). Del mismo modo, existió asociación entre hipofuncionalidad ovárica y ES ($p=0,049$). Los resultados demostraron una alta prevalencia de ES; la ultrasonografía y la videoendoscopia no presentaron asociación con la citología endometrial, aunque existió asociación comparando GE y LU por separado. Los antecedentes reproductivos, no estaban relacionados con ES, mientras que hubo asociación con la hipofuncionalidad ovárica.

Palabras clave: endometritis subclínica, citología, ultrasonografía, videoendoscopia, bovino de leche.

Abstract

Subclinical endometritis (SE) has been defined as inflammation of the endometrium in the absence of clinical signs. The objectives of the present study were 1: studying the prevalence of SE; 2: evaluating and comparing two diagnostic methods with cytology; and 3: evaluating the association of reproductive background with SE. Thirty cows between 31 and 61 days postpartum (DPP) were used. Diagnostic methods were: videoendoscopy of the caudal portion of the reproductive tract (external uterine orifice); ultrasonography of the uterine horns and ovaries; and endometrial cytology by gynecological endocervical brush. The positivity criteria used were: for videoendoscopy the secretion, inflammation and aperture of the cervix; for ultrasonography the endometrial thickness >8 mm (ET) and diameter of uterine lumen >3mm

(UL); and for endometrial cytology the percentage of polymorphonuclear neutrophils $\geq 8\%$ to 21-23 DPP, $\geq 6\%$ to 34-47 DPP, $\geq 4\%$ to 48-62 DPP. Results were evaluated with Fisher's exact test. The prevalence of SE in the group of animals studied was 53,3%. Ultrasonography and videoendoscopy were not related to cytology. However, analyzing the ultrasound variables separately, there was an association with cytology (ET $p=0,05$, UL $p=0,03$). Similarly, there was an association between ovarian hypofunction and SE ($p=0,049$). The results showed a high prevalence of SE; ultrasonography and videoendoscopy were not associated with endometrial cytology, although there was an association comparing ET and UL separately. Reproductive background was not related to SE, while there was association with ovarian hypofunction.

Key words: subclinical endometritis, cytology, ultrasonography, videoendoscopy, dairy cow.

1. Introducción y revisión bibliográfica

Uno de los principales objetivos que persiguen las empresas ganaderas abocadas a la producción láctea, es que sus vacas se preñen en el menor tiempo posible después del parto. En este sentido, las patologías reproductivas repercuten de manera negativa sobre esta meta evitando obtener una correcta eficiencia productiva (1,2). Por ello, resulta de suma importancia entender que el comportamiento reproductivo de las vacas lecheras después del parto depende de una adecuada involución uterina y, por lo tanto, del estado de salud del útero finalizado el periodo de espera voluntario (3). Por ejemplo, estudios anteriores en vacas lecheras han informado un aumento en el intervalo de tiempo parto-cubrición y una menor probabilidad de preñez en las vacas con problemas reproductivos como la endometritis subclínica (ES) diagnosticada después de los 40 o 50 días postparto (4). Asimismo, recopilando datos más actuales, otros autores (5) han demostrado el efecto de la ES en el intervalo desde el parto hasta la concepción. Estos investigadores afirmaron, que el 80% de las vacas sanas se preñaban dentro de los 200 días posteriores al parto, mientras que solo quedaban gestantes el 60% de las vacas con ES, lo que conlleva un retraso en el ciclo reproductivo (Figura 1).

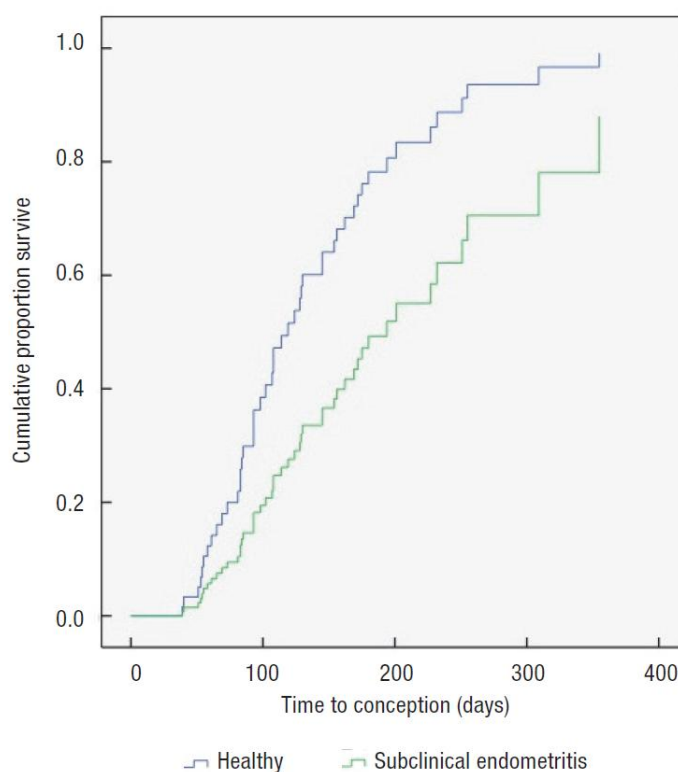


Figura 1. Intervalo entre el parto y la concepción según la presencia o ausencia de endometritis subclínica (5).

1.1. Postparto e involución uterina

La involución uterina comienza inmediatamente después del parto e implica, entre otras cosas, la regeneración del endometrio (6,7). El número de días después del parto en que se considera que el útero está completamente involucionado varía según los diferentes estudios. Bogado *et al.* (8), informaron que la involución uterina se completa entre los 21 y 25 días postparto; mientras que Sheldon *et al.* (2), indicaron que el tejido uterino en su conjunto requiere de 6 a 8 semanas para ser totalmente restaurado.

La dilatación de la vulva y la cervical durante el parto permiten la entrada de bacterias en el útero (7,9), por lo tanto, la contaminación bacteriana del tracto reproductor después del parto es común. Esta contaminación puede proceder de la cama, la suciedad del pelaje, las heces o del propio ambiente. Por ello, las endometritis en el postparto son enfermedades multifactoriales con gran impacto económico. Diferentes trabajos (7,10) han informado que el número de vacas lecheras con infección uterina durante las primeras 2 semanas después del parto es casi del 80% al 100%, a pesar de tener partos sin complicaciones.

Realizar un incorrecto manejo en el parto y la añadida infección por diversos microorganismos puede propiciar la aparición de endometritis (11). En el útero postparto de las vacas se han aislado diferentes agentes bacterianos entre los que podemos mencionar, *Escherichia coli*, *Streptococci spp*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bacillus licheniformis*, *Prevotella spp*, *Campylobacter fetus* y *Fusobacterium necrophorum*. De ellos, los agentes etiológicos que suelen causar la endometritis son *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter fetus*, *Fusobacterium necrophorum* aunque también pueden verse involucrados virus como el *Herpesvirus bovino 4* (10,12-14). Asimismo, algunas de estas bacterias actúan de manera sinérgica para agravar la patología. Un ejemplo de ello es el *Fusobacterium necrophorum* que produce una toxina que inhibe la fagocitosis e invade activamente los tejidos uterinos (15,16). Dicha toxina, protege a *Arcanobacterium pyogenes*, también presente en el medioambiente uterino, que a su vez sintetiza catalasa y un factor de crecimiento que ayuda a la multiplicación de *Fusobacterium necrophorum* (15).

1.2. Definiciones de enfermedades uterinas

Los mecanismos naturales de defensa inmunológica dentro del útero generalmente eliminan la infección aproximadamente al día 60 postparto (momento de la inseminación artificial). Sin embargo, en algunos animales, el sistema inmune se encuentra alterado y la infección persiste en el tiempo. Existen diferentes tipos de enfermedades uterinas en el postparto de las vacas lecheras. Las enfermedades más frecuentes descritas hasta el presente son: la metritis, la endometritis clínica, la endometritis subclínica y la piometra (2,17).

La metritis se ha definido como una infección uterina que se manifiesta como una enfermedad clínica. Se caracteriza por un útero agrandado que contiene un líquido acuoso de color marrón rojizo a una secreción uterina purulenta viscosa y blanquecina, que generalmente tiene olor fétido. La metritis ocurre con más frecuencia durante los primeros 10 días después del parto y puede haber factores predisponentes tales como la retención de membranas, la maceración fetal o las distocias (10,18,19).

La endometritis clínica (EC) se ha definido como una inflamación del endometrio sin enfermedad sistémica que puede estar acompañada de secreción purulenta o mucopurulenta. El cérvix está dilatado después de 20 días postparto, presenta diámetro mayor a 7,5cm o una secreción mucopurulenta después de 26 días postparto (20).

La endometritis subclínica (ES) se ha definido como una inflamación del endometrio con ausencia de signos clínicos. Esta inflamación presenta polimorfonucleados neutrófilos (PMN N) dentro del lumen uterino, debido a la persistencia de una infección moderada o al retraso de la involución uterina (10,18,19). Es importante destacar que las vacas diagnosticadas con ES también deben tener más de 26 días después del parto para que la condición no se confunda con la involución uterina normal (18).

Por último, la piometra se caracteriza por una acumulación de exudado purulento de cantidad variable dentro del lumen uterino y concurre con la presencia de un cuerpo lúteo persistente en el ovario (21).

1.3. Endometritis subclínica

Como comentamos anteriormente, en ausencia de signos clínicos externos de la enfermedad, las alteraciones del endometrio uterino pueden ser definidas como endometritis subclínicas (11,18). A nivel mundial, la ES afecta la eficiencia reproductiva de entre el 20% y

40% de las vacas de leche (18,22,23), debido al fallo en el desarrollo embrionario temprano por alteraciones irreversibles en la calidad del embrión (24). Los signos reproductivos más evidentes son el aumento del intervalo entre el parto y la primera cubrición o inseminación artificial (IA), del intervalo parto-concepción e intervalo parto-parto, y de la cantidad de cubriciones o IA necesarias por preñez (4,25,26). Igualmente, en el año 2011, Green *et al.* (27), informaron que la ES modifica las concentraciones de esteroides ováricos y, consecuentemente, la calidad de los ovocitos. De este modo, estos autores explicaron en parte, las bajas tasas de concepción y el mayor intervalo entre el parto y la concepción asociados a esta patología.

Debido a la ausencia de indicadores externos en la ES, su diagnóstico se fundamenta en el aumento de la proporción de PMN N en muestras de células endometriales obtenidas mediante lavados uterinos, o por medio de la recolección de células con un cepillo endocervical ginecológico de uso humano (22,28). Debido a su fácil preparación, alta especificidad y media sensibilidad, en la actualidad, la citología endometrial es la prueba mejor considerada para el diagnóstico de ES (29).

En la última década se han investigado y redefinido varios aspectos de la inflamación del endometrio, entre ellos la definición de ES (29). Las modificaciones del lumen uterino serán denominadas como ES, siempre y cuando no aparezcan signos clínicos externos (17,18). Por otro lado, Wagener *et al.* (29), propusieron redefinir el evento como endometritis citológicas ya que el diagnóstico se realiza mediante citología endometrial.

De este modo, actualmente se utilizan los términos de descarga vaginal purulenta en lugar de EC y endometritis citológica en reemplazo de ES. Si bien los términos pretéritos de EC y ES hacen referencia a la terminología clásica de enfermedad, las expresiones actuales, descarga vaginal y endometritis citológica, representan una mezcla de síntomas y técnicas de diagnóstico (29).

Por otro lado, la prevalencia es la proporción de individuos en una población que presentan en un momento determinado una característica determinada (9). La prevalencia de ES varía entre las distintas investigaciones y, dependiendo del país, existe una amplia dispersión en los valores (9). Gilbert *et al.* (4), informaron que la prevalencia de esta enfermedad en vacuno lechero es del 53% entre los 40-60 días después del parto. Sheldon *et al.* (19), informaron valores de ES entre 11% y 40%. En España se han informado cifras del 2,6% al 4,5%, 6,25% en Dinamarca, 47,6% en Corea, entre 5,6% y 10,9% en Austria y en Reino Unido

10,1% (9). En EEUU las cifras varían entre 41% y 51% en los días 20 a 47 del postparto (25), en Argentina entre 19% y 38% en los días 18 a 52 del postparto (28), y en Bélgica 27,8% a más de 60 días postparto (8).

Hay que tener en cuenta que existen factores de riesgo que pueden afectar directa o indirectamente a la prevalencia de ES. Estos factores se clasifican como extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos se refieren a todas las condiciones y características ambientales como el momento del parto o la nutrición. Por el contrario, los factores intrínsecos son variables específicas tales como el número de partos, las distocias, la retención de placenta, la hipocalcemia, un balance energético negativo (BEN) o la mastitis (12). En referencia al BEN, podemos señalar que, después del parto, la vaca experimenta un período de altos requerimientos energéticos relacionados con la producción de leche. Estos altos requerimientos, a su vez, están asociados a una ingesta insuficiente de alimento o alimento de pobre calidad. Esta situación produce un BEN, que lleva a cambios metabólicos y hormonales y alteran el sistema inmune de las vacas. Esta inmunosupresión se inicia tres semanas antes del parto, es máxima al momento del parto y continúa durante tres a cuatro semanas postparto (30). La inmunidad innata de los neutrófilos es la respuesta primaria en el útero y es la principal afectada como consecuencia del BEN. La inflamación y la infección del endometrio retrasan la involución uterina normal, siendo ésta la causa principal de alteraciones en los índices reproductivos (31).

Cabe señalar que la ES no es una patología exclusiva del ganado lechero, también se ha diagnosticado en sistemas de producción de carne. El motivo por el que se estudia mayormente en el ganado lechero, es que el vacuno de carne tiene un manejo más difícil, al mismo tiempo que se ha visto que tienen una prevalencia menor de la enfermedad (32). Al vacuno lechero se le exige una buena producción de leche mientras está gestando un ternero, por lo que la demanda energética es mayor y el sistema inmune se ve debilitado. Por su parte, en el vacuno de carne se requiere un ternero y una menor producción láctea, de este modo, el sistema inmune tiene suficientes recursos para combatir la endometritis subclínica (33).

La identificación de la ES en vacuno lechero, toma especial importancia en el período postparto. Un diagnóstico temprano va a permitir realizar el tratamiento de la patología, lo que llevará a restablecer el intervalo normal parto-concepción y evitar de esta manera las pérdidas económicas (13).

1.4. Técnicas de diagnóstico de endometritis subclínica

El diagnóstico de la ES se puede realizar mediante varios métodos, entre los que encontramos la citología endometrial mediante lavados uterinos o con cepillo ginecológico (22,28), la ultrasonografía (34), la vaginoscopia (35) y la biopsia endometrial (13). En general, lo que se pretende, es conseguir una herramienta de diagnóstico que pueda ser utilizada en condiciones de campo, con resultados relativamente inmediatos, cuya sensibilidad y especificidad sean elevadas y al menor coste posible. Por ello, los métodos más utilizados son la citología endometrial con recuento de polimorfonucleados neutrófilos, y la ultrasonografía transrectal que se basa en el aumento del diámetro del lumen uterino y el incremento en el grosor del endometrio (34).

Para el estudio de la ES, también hay que tener en cuenta otros factores que pueden predisponer su aparición, como son el número de días postparto, el número de partos, o el historial de patologías que haya podido tener anteriormente (4,12,16).

En cuanto a los días postparto, no es posible establecer un diagnóstico de ES hasta pasados los primeros 30 días, debido a que este es el periodo fisiológico de involución uterina y podría conllevar a obtener falsos positivos. Las diferencias existentes en la bibliografía hasta el presente, establecen que no hay un valor de corte definido del porcentaje de PMN N para establecer la presencia o ausencia de esta patología según los días postparto (1). Madoz *et al.* (22), informaron de la evolución de la citología endometrial en el postparto. De este modo, entre los días 21 y 33, se encontraba un 8% de PMN N e iba disminuyendo progresivamente hasta llegar a un 4% en los días 48 a 62. También observaron que aquellas vacas que superaban estos parámetros podían aumentar el intervalo de parto-cubrición de 30 a 60 días (22,36). Sin embargo, el rango establecido por Kasimanickam *et al.* (25) es: mayor de 18% PMN N para los 21 a 33 días postparto y mayor al 10% entre 34 y 47 días postparto. Por otra parte, Gilbert *et al.* (4), determinaron como valor mínimo 5% PMN N entre los 40 y 60 días postparto. En la Tabla 1 se describen los puntos de corte en los porcentajes de PMN N estudiados por los distintos investigadores en los diferentes periodos postparto.

Tabla 1. Valores de corte de PMN N para diagnóstico de ES informados en los diferentes periodos postparto (adaptado de Quintela *et al.* (13)).

Autores	Periodo postparto de diagnóstico	Valores de corte %PMN N
Lopdell <i>et al.</i> (37) Kasimanickam <i>et al.</i> (25) Heidarpour <i>et al.</i> (38) Kaufmann <i>et al.</i> (39)	Semana 3 a 5	>18,0%
Madoz <i>et al.</i> (22)	Semana 3 a 5	≥8,0%
Dubuc <i>et al.</i> (40)	Semana 3 a 5	>6,0%
Plöntzke <i>et al.</i> (28)	Semana 3 a 5	>5,0%
Lopdell <i>et al.</i> (37)	Semana 5 a 7	>18,0%
Kasimanickam <i>et al.</i> (25)	Semana 5 a 7	>10,0%
Barlund <i>et al.</i> (35)	Semana 5 a 7	>8,0%
Madoz <i>et al.</i> (22)	Semana 5 a 7	≥6,0%
Plöntzke <i>et al.</i> (28) Barrio <i>et al.</i> (5)	Semana 5 a 7	>5,0%
Madoz <i>et al.</i> (22) Dubuc <i>et al.</i> (40)	Semana >7	≥4,0%

Por otra parte, otros autores como Recce *et al.* (41) informaron que el número de lactancias, la condición corporal y la genética, son factores que no están relacionados con el desarrollo de endometritis. Mientras que la hipofuncionalidad ovárica, es consecuencia de la enfermedad (17,42,43).

La validez de una prueba diagnóstica, es posible medirla mediante los valores de especificidad y sensibilidad. La especificidad se define como la probabilidad de que un animal negativo a la prueba, realmente no tenga la enfermedad. En cambio, la sensibilidad muestra la posibilidad de que un animal positivo a la prueba esté realmente enfermo. De este modo, se pueden comparar las pruebas según la facilidad de uso, el tiempo hasta obtener los resultados y la sensibilidad y especificidad (1). Los métodos más sencillos de utilizar son la ultrasonografía y la vaginoscopia, seguido de la citología mediante un cepillo ginecológico, dejando el lavado uterino y la biopsia como las opciones más complejas de ejecutar (1). Por otro lado, el tiempo hasta obtener el resultado en las técnicas de ultrasonografía y vaginoscopia es inmediato. Sin embargo, en la citología endometrial es necesario obtener, preparar y analizar las muestras, aunque es posible hacerlo en la propia granja. En el caso del lavado uterino y la biopsia, es preciso esperar a los resultados de los análisis que, generalmente, se realizan en laboratorios apropiados. Finalmente, la sensibilidad de la ultrasonografía y la vaginoscopia son menores si la comparamos con la biopsia y la citología endometrial. Sin embargo, la especificidad es similar en todas las herramientas diagnósticas excepto para vaginoscopia que es menor (1,35).

1.4.1. Videoendoscopia y vaginoscopia

Por tratarse de un método rápido y poco invasivo, en la perra, se ha utilizado la videoendoscopia del tracto reproductor caudal para evaluar el estado reproductivo del animal (44). La videoendoscopia permite examinar el aspecto de la mucosa y el tipo y cantidad de secreciones presentes en la vulva, el vestíbulo, la vagina y el orificio uterino externo o *portio vaginalis* del cérvix (45). Para ello, el videoendoscopio es introducido por la vulva en un ángulo de 45° en dirección craneal y se toman imágenes de cada una de las partes de la porción caudal del tracto reproductor (44).

A diferencia de la perra, en la especie bovina, Barlund *et al.* (35) y Drillich *et al.* (46) utilizaron la vaginoscopia para evaluar la porción caudal del tracto reproductor y diagnosticar de endometritis en vacuno de leche. Para realizar la vaginoscopia introdujeron un espéculo por la vagina, previamente lubricado, y se observaron los distintos componentes del tracto reproductor caudal con especial énfasis en el *portio vaginalis* del cérvix. En los estudios mencionados, se evaluó la presencia o ausencia y el tipo de secreción presentes en esta región. De este modo, se informó que el uso de la vaginoscopia fue adecuado para el diagnóstico de endometritis clínica. Sin embargo, estos mismos autores (35,46) han informado que no fue suficiente para diagnosticar las endometritis subclínicas en el ganado bovino después de la cuarta semana postparto.

1.4.2. Ultrasonografía uterina

La ultrasonografía transrectal bidimensional en modo B es una de las herramientas de diagnóstico comúnmente utilizada para la exploración del estado del tracto reproductor en animales de granja. Una imagen ecográfica bidimensional es una matriz de píxeles (unidad básica de una imagen digital), que varían en valores en escala de grises desde 0 (negro absoluto o anecoico) a 255 (blanco absoluto o hiperecoico). Para hacer una correcta utilización de la ecografía es necesario conocer cómo son las imágenes fisiológicas para poder ver las diferencias e identificar las patologías (34). La Figura 2 corresponde a una imagen en la que se muestra un corte transversal de un cuerno uterino de aspecto normal en una hembra bovina a los 50 días postparto. En ella podemos observar el endometrio (señalado en rojo) de aspecto y tamaño normal y un adecuado tamaño del lumen uterino (señalado en azul). De este modo, la ultrasonografía permite evaluar distintos aspectos fisiológicos en el sistema reproductor, que cubren principalmente la detección de preñez en etapas tempranas, la dinámica folicular en los ovarios y la predicción del tiempo de ovulación (1,34). Del mismo modo, podemos observar

y evaluar diferentes patologías mediante cambios en el endometrio, el tamaño y contenido del lumen uterino, así como la existencia de patologías ováricas (1). El diagnóstico de ES mediante imágenes de ultrasonido se basa principalmente en observar el incremento en el grosor del endometrio y el diámetro del lumen uterino. Según Barlund *et al.* (35), la inflamación está establecida cuando el espesor del endometrio es mayor a 8 mm. y el diámetro del lumen uterino es mayor a 3 mm.

Sin embargo, la sensibilidad de la técnica cuando se aplica este criterio es variable ya que depende de factores tales como la calidad de imagen, el equipo, el tipo de cursor con el que se miden las diferentes estructuras y la experiencia del evaluador. Polat *et al.* (34) y Salah *et al.* (47) determinaron que esta herramienta tiene una sensibilidad de entre 59,4% y 83,3% y una especificidad de 69,7% a 73,3% respectivamente.

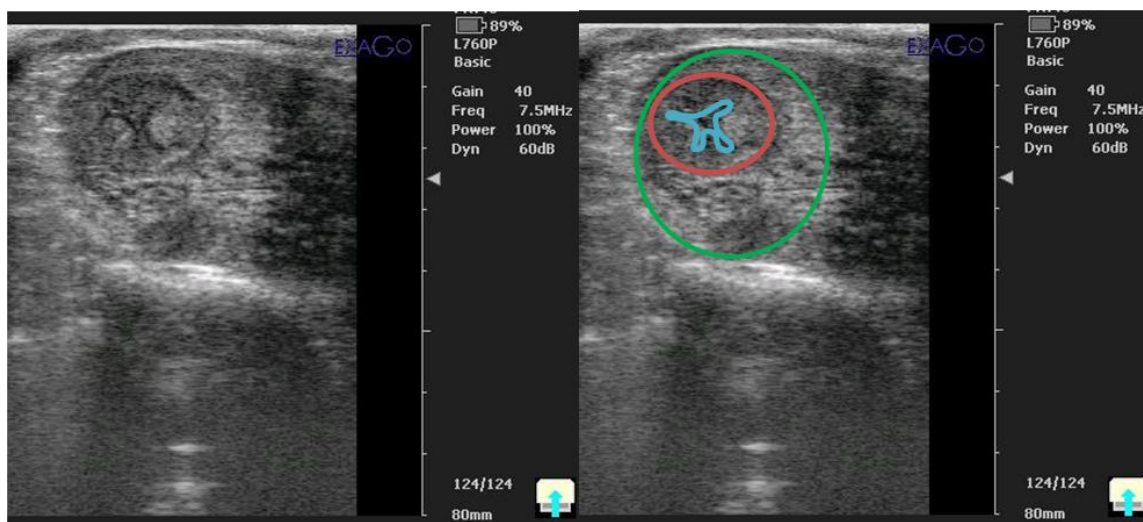


Figura 2. Izquierda. Imagen ecográfica de un cuerno uterino de apariencia normal a los 50 días postparto. Derecha. Descripción de las partes anatómicas de la misma imagen. El color verde señala el cuerno uterino, el rojo el endometrio y el azul el lumen uterino (elaboración propia).

También es importante tener en cuenta el momento del ciclo estral y los días postparto en el que se toman las muestras. En general, las vacas en proestro, estro y metaestro, o con un perfil de estrógenos elevado, pueden presentar un grosor endometrial superior de 8 mm. y un diámetro del lumen mayor a 3 mm. con presencia de contenido anecoico (35,48). Además, la involución del útero y el cuello uterino no se completan hasta 30 días después del parto (18); por lo tanto, hay que tener en cuenta también este hecho cuando se realiza el diagnóstico de ES en vacas postparto (34).

Debido a la facilidad de uso y al tratarse de una herramienta no invasiva, la ecografía es el método de diagnóstico inmediato preferido en la reproducción animal (34,48). Sin embargo, otros autores (25,49) proponen utilizarla como método complementario con la citología para optimizar la información y confirmar la presencia o ausencia de enfermedad.

1.4.3. Citología endometrial

1.4.3.1. Cepillo endocervical ginecológico

Como comentamos anteriormente, esta técnica se fundamenta en el incremento de PMN N en muestras de células endometriales (Figura 3) obtenidas con un cepillo endocervical ginecológico de uso humano, también denominada “técnica de Cytobrush®” (13,22,28). Con este método se consigue la recuperación de células bien conservadas, representativas de una gran área de superficie endometrial, sin causar daño al tracto reproductivo para resultados citológicos consistentes y confiables (1,11,14). Sumado a esto, la técnica es de fácil aplicación, utiliza material desechable y no requiere de equipamiento costoso (35). Además, el porcentaje de PMN N no varía significativamente a lo largo del ciclo estral, por lo que apenas se diagnostican falsos positivos (22).

Una vez obtenida la muestra, se extiende sobre un portaobjetos previamente desengrasado, se fija y se tiñe. El diagnóstico se realiza estableciendo la proporción de PMN N, sobre el total de células contadas según la siguiente fórmula (1):

$$\%PMN N = \frac{n PMN N}{C.T.} \times 100.$$

Donde:

- %PMN N es el porcentaje de polimorfonucleados neutrófilos.
- nPMN N es el número de polimorfonucleados neutrófilos contados en la preparación.
- C.T. son las células totales contadas en la preparación (epiteliales y PMN N).

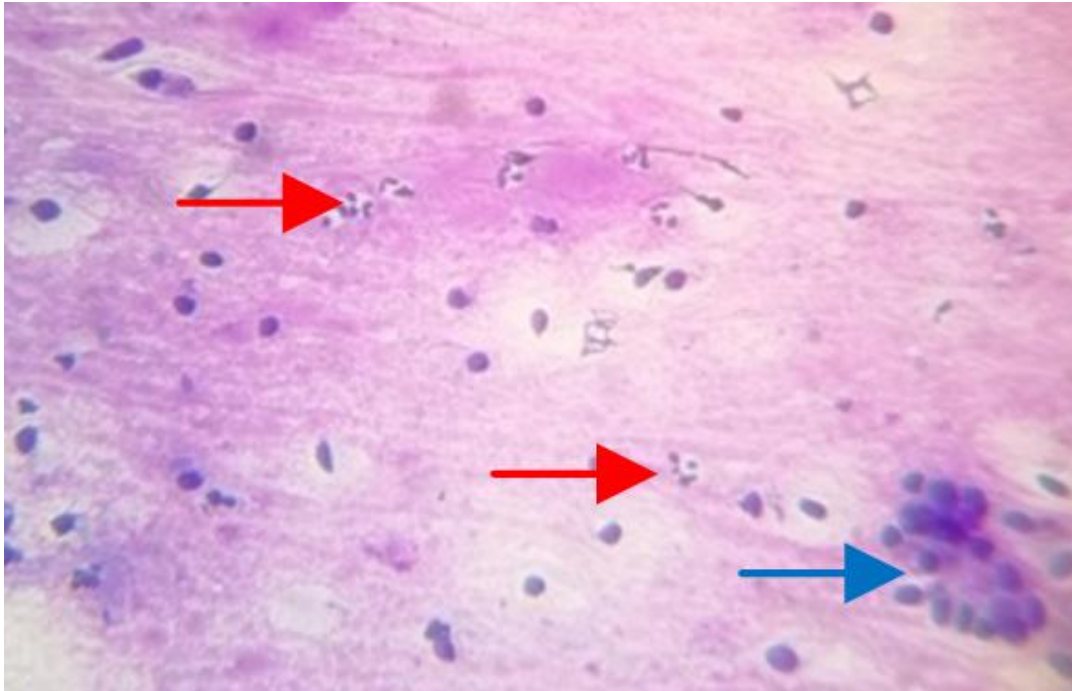


Figura 3. Citología endometrial obtenida por cepillo endocervical ginecológico donde se observan; PMN N (flechas rojas) y células endometriales (flecha azul) (elaboración propia).

La razón por la que es necesario el recuento de PMN N se debe a que su incremento, puede ser indicativo de inflamación debido a una posible infección bacteriana. Es importante determinar la presencia de infección en el útero para instaurar un tratamiento precoz y poder asegurar un acortamiento del intervalo parto-gestación, logrando el objetivo de una lactancia y un ternero por año (2).

En diversos estudios se ha informado la sensibilidad y especificidad para este método. Todos ellos, apuntan a que presenta una mayor especificidad que sensibilidad. De Boer *et al.* (50), informaron de una sensibilidad entre 17% y 86% y una especificidad entre 42% y 94%.

1.4.3.2. Lavado uterino

Otra forma de obtener una muestra de células endometriales, es mediante la técnica del lavado uterino. Esta práctica consiste en introducir solución salina estéril en el lumen uterino con un catéter que se introduce a través del cérvix. Seguidamente, por vía rectal se realiza un masaje en los cuernos uterinos para distribuir el fluido, el cual es posteriormente recogido. La muestra obtenida, se centrifuga, se desecha el sobrenadante y el sedimento se extiende en un portaobjetos. Como se ha descrito anteriormente, la muestra se fija, se tiñe y se observa al microscopio. La proporción de PMN N sobre el total de células contadas se realiza utilizando la fórmula matemática descrita en el apartado anterior (35).

2. Objetivos

Por todo lo dicho anteriormente, los objetivos del presente trabajo fueron:

1. Evaluar la prevalencia de endometritis subclínica mediante citología endometrial en un grupo de hembras de entre 31 y 61 días postparto.
2. Evaluar y comparar la videoendoscopia y el ultrasonido, con la citología endometrial para el diagnóstico de endometritis subclínica en bovinos de leche.
3. Evaluar la asociación entre las variables días postparto, número de partos previos, abortos y patologías ováricas, con la endometritis subclínica.

3. Materiales y métodos

3.1. Localización del establecimiento

La Emilia-Romaña es una región importante en el sector agroalimentario y artesanal y entre sus principales productos, famosos en el mundo, podemos mencionar el queso parmesano (Parmigiano Reggiano) o el jamón de Parma. En esta región la Confederazione italiana Agricoltori Regionale, C.I.A. Emilia-Romagna, agrupa empresas dedicadas a la producción de productos artesanales, entre las que encontramos, a la Fattoria San Rocco que se encuentra ubicada en la localidad de Monteveglio comuna de Valsamoggia, Boloña, Italia.

La Fattoria San Rocco de Adolfo y Giorgio Filipini es una empresa que, desde hace más de 70 años, se dedica a la producción e industrialización de leche, cuenta con 588 hectáreas y 580 vacas Holstein Friesian que producen un promedio de 35,7 kg/día. El 40% de los animales son hembras primíparas, el 25% hembras de segundo parto, el 18% hembras de tercer parto y el 17% restante hembras de cuatro partos o más. El total de leche producida, más lo que la empresa adquiere de productores asociados, se destina a la fabricación de quesos entre los cuales el más importante en cuanto a volumen producido es el Parmigiano Reggiano.

3.2. Características del alojamiento y manejo nutricional

Las naves de estabulación presentaban una superficie de 16m² por animal con libre circulación y cubículos con cama de arena, ventilación natural y ventiladores para incrementar la circulación del aire en época estival.

Todos los animales tenían agua y alimentación a libre disposición. Dicha alimentación se ajustó a los requerimientos nutricionales correspondientes a cada etapa productiva y reproductiva (51). Las raciones se fabricaron a base de grano de maíz molido, cebada, silo de pradera consociada, heno de alfalfa, harina de soja, semilla de algodón, además de un núcleo vitamínico-mineral.

3.3. Manejo reproductivo y sanitario

De manera rutinaria, en el periodo postparto se realizaban controles de la salud reproductiva de las vacas mediante ecografía, en las semanas previas a la finalización del periodo de espera voluntario (40 a 50 días). Mediante este examen se verificaba la involución del tracto reproductor y el estado de los ovarios (dinámica folicular, hipofuncionalidad, etc.). Sin embargo, a pesar de este tipo de control, el número de IA necesarias para preñar los

animales y los índices de fertilidad estaban alterados. Por ello, en el año 2018 se estimó necesario ampliar los controles postparto e incluir la citología endometrial entre los días 30 y 65. Tanto la toma de muestras como la lectura y diagnóstico fue realizado por el grupo de veterinarios a cargo de la empresa. Desde el punto de vista sanitario, el establecimiento cumplía con los controles veterinarios oficiales de la región de Bolonia. Además, los animales fueron vacunados con vacuna trivalente (*E. coli*, *Coronavirus* y *Rotavirus*) (Rotavec® Corona, MSD) al final de la gestación y de diarrea vírica bovina (Hiprabovis®, Hipra) cada año.

3.4. Selección de animales incluidos en el estudio

Para el estudio fueron seleccionadas treinta vacas Holstein Friesian de primer a sexto parto. En el momento de inicio del trabajo, todas las hembras se encontraban entre los 31 a 61 días postparto. Además, se tuvieron datos de patologías reproductivas previas tales como abortos y patologías ováricas probablemente asociadas a la presencia de ES.

3.5. Herramientas de diagnóstico

Para la consecución de los objetivos planteados, todos los animales fueron sometidos a tres diferentes técnicas de diagnóstico. El orden en que se realizaron las pruebas se asignó con el objeto de evitar la interferencia en el resultado de la técnica posterior. En primer lugar, se realizó la videoendoscopia para la evaluación de descargas cervicales, inflamación y grado de apertura del *portio vaginalis* del cérvix. A continuación, se efectuó la ultrasonografía transrectal y finalmente se realizó la citología endometrial con un cepillo endocervical ginecológico.

3.5.1. Videoendoscopia

Previo al trabajo con los animales se prepararon el endoscopio inalámbrico (F140, WIFI for Android; Akozon, China) y el espéculo desechable (Minitub Ibérica, España) (Figura 4) y se comprobó la correcta recepción y almacenamiento de imágenes en el dispositivo móvil. Seguidamente, se limpió y desinfectó la región perineal del animal, se lubricó el espéculo con gel (ReproJelly, Minitub Ibérica, España) y con la mano izquierda se abrieron los labios de la vulva. El conjunto espéculo-endoscopio se introdujo por la vagina en dirección craneal en un ángulo de 45° para evitar el contacto con el orificio uretral externo. Una vez ubicado en la proximidad del *portio vaginalis* del cérvix, se tomaron entre 1 y 4 imágenes. Asimismo, se evaluó la presencia o ausencia de material en el vestíbulo, el grado de apertura y la inflamación del *portio vaginalis* del cérvix, siendo este último un criterio subjetivo.

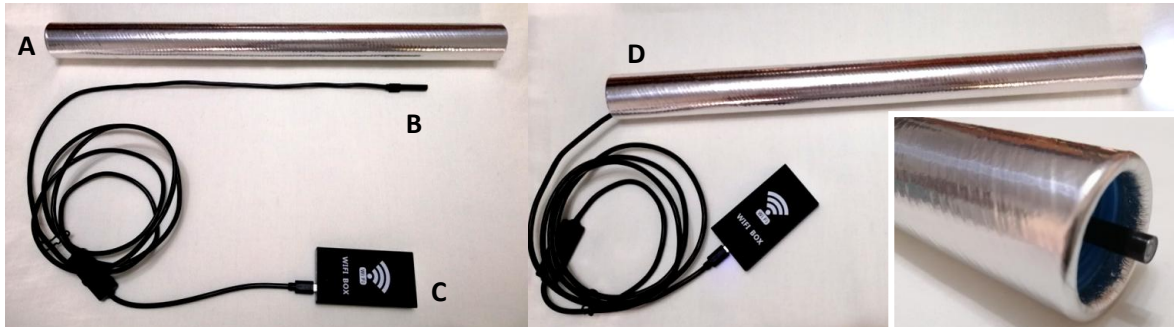


Figura 4. Montaje del videoendoscopio y el espéculo. A. Espéculo. B. Videoendoscopio. C. Transmisor inalámbrico de imágenes por red Wi-Fi. D. Conjunto videoendoscopio y espéculo montados.

3.5.2. Ultrasonido

Finalizada la videoendoscopia, se procedió a realizar el ultrasonido ginecológico con un ecógrafo veterinario portátil (ExaGo®, IMV Imaging, Francia) provisto de una sonda transrectal lineal de 7,5 MHz (Figura 5). El examen se realizó con la siguiente configuración del equipo de ultrasonido: profundidad 100mm., foco 40mm., ganancia proximal 18, media de 16, distal 64; rango dinámico 60 y suavidad 2. Previo al examen, se procedió a eliminar la materia fecal del recto. Se realizó un examen por palpación transrectal introduciendo la mano diestra por el recto del animal, enfundada con un guante de palpación y lubricado con gel (ReproJelly, Minitub Ibérica, España). En el examen ultrasonográfico se analizó todo el sistema reproductor desde el vestíbulo vaginal hasta los ovarios, tomando imágenes transversales de los cuernos uterinos y diferentes cortes de ambos ovarios.

El diagnóstico de la endometritis subclínica mediante imágenes de ultrasonido se basó en la medición del grosor endometrio y el diámetro del lumen uterino. Siguiendo el criterio de Barlund *et al.* (39), los valores de espesor del endometrio y diámetro del lumen uterino para considerar inflamación fueron > 8 mm. y > 3 mm. respectivamente. Asimismo, y en el caso de que se presentase contenido en el lumen uterino, se evaluó la cantidad y calidad del fluido (aneicoico o hipercoico).



Figura 5. Ecógrafo portátil ExaGo® con sonda transrectal lineal de 7,5 MHz.

3.5.3. Citología endometrial

Una vez finalizado el examen por ultrasonografía, se procedió a realizar la citología endometrial. Previamente se preparó todo el material necesario, el cepillo recolector de la muestra, los portaobjetos y vasos para la tinción. El cepillo para recolectar la muestra, constó de un cepillo endocervical ginecológico de uso humano (Henry Schein S.A., España), cuyo mango se cortó a 3 cm. de longitud y se sujetó a un pistolete de inseminación artificial (IA) (QuickLock clásico, Minitub Ibérica, España). Este cepillo se recubrió con una vaina para IA (vaina universal para IA ranurada, Minitub Ibérica, España) como se muestra en la Figura 6. Los portaobjetos fueron limpiados, desengrasados con alcohol 96° y rotulados con el código identificativo del animal.

El método para recoger las muestras fue el siguiente: nuevamente, se limpió la vulva para eliminar la posible suciedad que hubieran provocado los métodos anteriores (Figura 7). Se limpió la región perianal, se introdujo la mano derecha en el recto del animal hasta localizar el cérvix y se mantuvo retenido (Figura 8). A continuación, se introdujo por la vagina el pistolete de IA con el cepillo ginecológico, hasta alcanzar y atravesar el cérvix (Figura 9). Una vez ubicado dentro del útero se dirigió hacia el cuerno uterino seleccionado al azar. Se exteriorizó el cepillo de la vaina en el tercio craneal y se giró una vuelta completa (360°) en el sentido de las agujas del reloj, rozando suavemente la mucosa endometrial con las cerdas y colectando así la muestra necesaria (Figura 10). Una vez obtenida la muestra, se volvió a introducir el cepillo dentro de la vaina para evitar contaminaciones y se extrajo del animal (Figura 11).

Posteriormente, una vez fuera del animal, el cepillo se volvió a exteriorizar y se hizo rodar sobre un portaobjetos (Figura 12). Se dejó secar durante aproximadamente un minuto a temperatura ambiente. Se cambiaron el cepillo y la vaina y se repitió la operación con la siguiente vaca, así hasta completar los treinta animales del estudio. Seguidamente, como se observa en la Figura 13, las muestras se fijaron y se tiñeron con Diff-Quick™ (Sanilabo, España). Los preparados (Figura 14) se examinaron con microscopio binocular (BH2, Olympus, España) a x400 y se realizó un recuento total de un mínimo de 200 células diferenciando células epiteliales endometriales y polimorfonucleados neutrófilos (1).

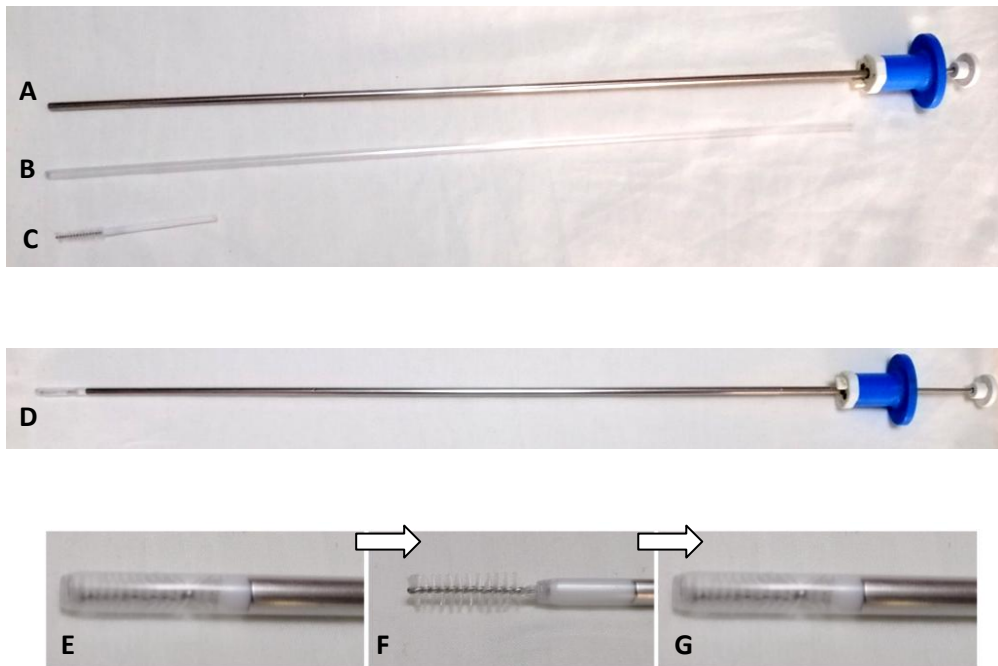


Figura 6. A. Pistoleta de IA, B. Vaina desechable, C. Cepillo endocervical ginecológico. D. Montaje del cepillo endocervical en el pistoleta de IA. E. Cepillo en el interior de la vaina. F. Extracción del cepillo dentro del cuerno uterino. G. Introducción del cepillo en la vaina para extraerlo del animal.



Figura 7. Limpieza de la región perianal.



Figura 8. Palpación rectal, localización y sujeción del cérvix.

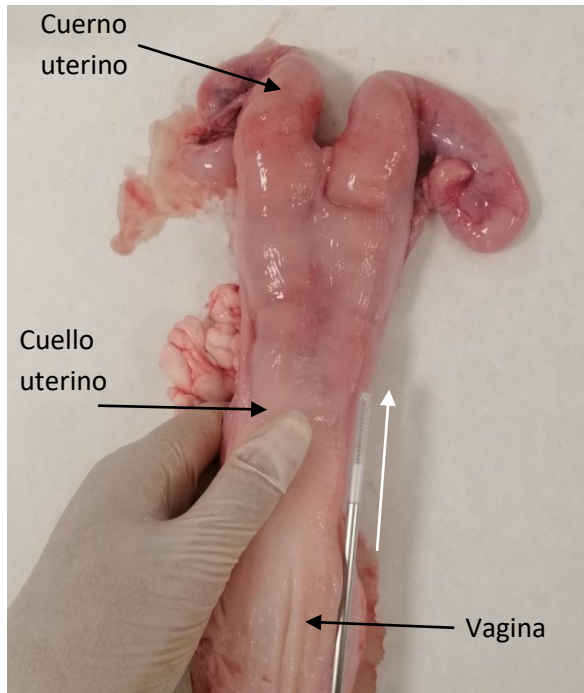


Figura 9. Introducción del pistolete.



Figura 10. Exteriorización del cepillo y giro de 360°.



Figura 11. Resguardar cepillo y extraer del animal.

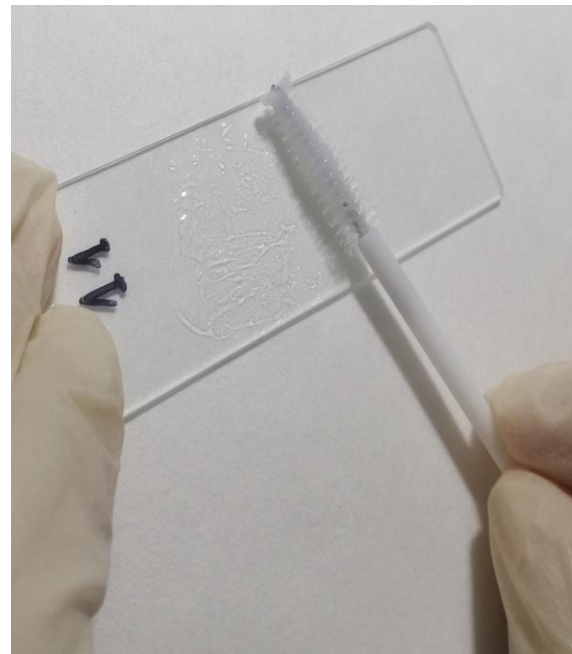


Figura 12. Extensión de la citología.

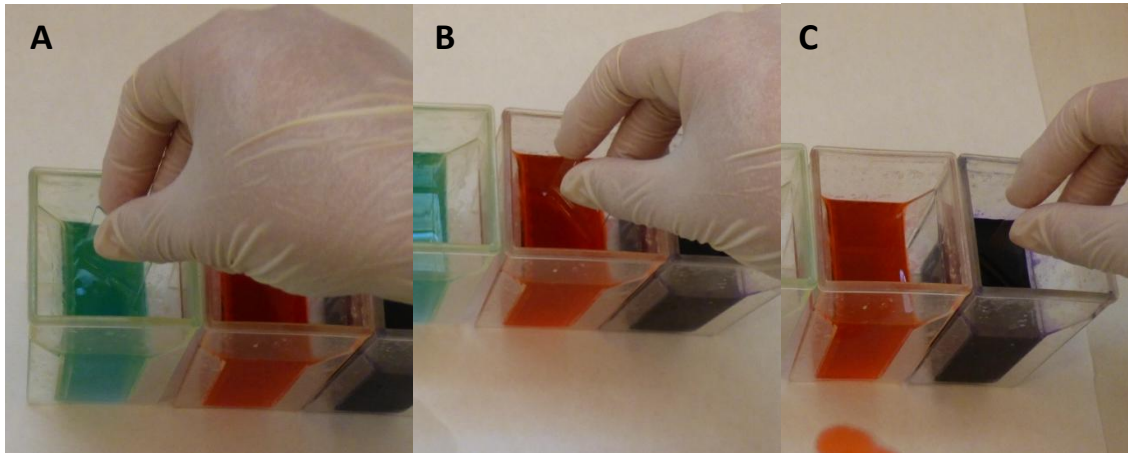


Figura 13. Tinción Diff-Quick®: A. Fijación 15 seg. (alcohol metílico). B. Eosina 15-20 seg. C. Azul metilino 15-20 seg.

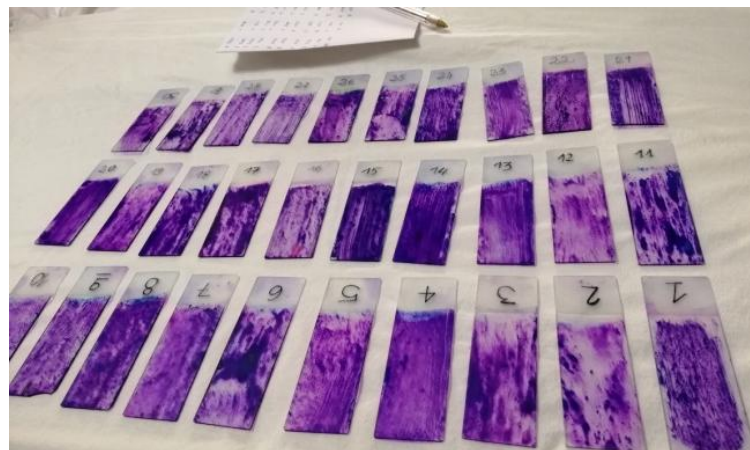


Figura 14. Preparados citológicos.

El diagnóstico de la ES mediante citología endometrial se basó en los valores de porcentaje de polimorfonucleados neutrófilos (% PMN N) obtenidos en las muestras, siguiendo el criterio publicado por Madoz *et al.* (21). Se consideraron positivos a ES a todos los animales cuyos preparados poseían un porcentaje PMN N mayor o igual al 8% a los 21 a 33 días postparto, mayor o igual al 6% a los 34 a 47 días postparto y mayor o igual al 4% a los 48 a 62 días postparto.

3.6. Evaluación de los resultados

3.6.1. Antecedentes reproductivos

Los animales se agruparon en función de los días postparto y se tuvo en cuenta los antecedentes anteriores de abortos y cantidad de partos. Tras la ecografía se anotó si presentaban alguna patología ovárica como hipofuncionalidad.

3.6.2. Prevalencia de endometritis subclínica

Para calcular la prevalencia se utilizó la siguiente fórmula:

$$Prevalencia = \frac{Ct}{Nt} \times 100$$

Donde:

- Ct es el número de casos de enfermedad existentes en el momento estudiado.
- Nt es el número total de individuos estudiados.

3.6.3. Herramientas diagnósticas y antecedentes reproductivos

Para comparar los diferentes métodos de diagnóstico se realizó un análisis bivalente mediante el software IBM® SPSS® Statistics, versión 23, con licencia shareware.

La comparación de las variables diagnosticadas por ecografía y endoscopia con la citología, y el efecto de los antecedentes reproductivos sobre la aparición de ES, fueron analizados mediante la prueba exacta de Fisher, siendo significativa cuando el valor de $p \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Antecedentes reproductivos

Se organizaron todos los datos existentes de los antecedentes reproductivos de los animales y de las patologías ováricas que se hayan observado en la ecografía. En la Tabla 2 se presentan los datos individuales de los animales incluidos en el presente trabajo.

La primera variable estudiada fue los Días postparto, según los cuales se clasificaron en 6 grupos. En el primero de 31 a 35 días (n=8), en el segundo de 36 a 40 días (n=5), el tercero de 41 a 45 días (n=6). En el cuarto grupo, del día 46 al 50 (n=6), en el quinto grupo de 51 a 55 días (n=1) y finalmente más de 55 días postparto (n=4).

La siguiente variable fue el Número de partos que ha tenido cada vaca. De las vacas del estudio (n=30), 7 eran de primer parto, 8 de segundo, 5 de tercero, 9 de cuarto y 1 de sexto parto.

Otras variables estudiadas fueron Patologías previas (Abortos) o Patologías ováricas como consecuencia de una posible endometritis (Patologías). En este caso, 4 vacas del estudio habían tenido abortos y otras presentaron hipofuncionalidad ovárica (n=8).

Tabla 2. Antecedentes reproductivos individuales de los animales incluidos en el estudio.

Crotal	Días postparto	Nº partos	Patologías y Abortos
4303	31	3	NO
4983	31	1	Hipofuncionalidad ovárica
4151	31	4	NO
4752	32	2	NO
4879	33	1	Hipofuncionalidad ovárica
4181	33	3	Hipofuncionalidad ovarica
4957	35	1	Aborto
5007	35	1	NO
4979	37	1	Hipofuncionalidad ovárica
4707	40	2	NO
4033	40	4	Hipofuncionalidad ovárica
3674	40	6	Aborto e hipofuncionalidad ovárica
4455	40	3	NO
4952	41	1	Aborto
4706	43	2	NO
4028	43	4	NO
4693	44	2	NO
4710	44	2	NO
4074	45	4	NO
4731	48	4	NO
5014	48	1	NO
4174	48	4	NO
4712	49	2	Hipofuncionalidad ovárica
4329	49	2	NO
4434	50	3	NO
4551	53	2	Aborto
3890	56	4	NO
4191	57	4	NO
4220	57	4	Hipofuncionalidad ovárica
4521	61	3	NO

4.2. Prevalencia de endometritis subclínica

La prueba utilizada de rutina para la determinación de endometritis subclínica en este establecimiento fue la citología. De este modo, en la población estudiada, se diagnosticaron 16 vacas positiva a ES y 14 vacas sanas. Por lo tanto, la prevalencia fue del 53,3% (Tabla 3).

4.3. Resultado pruebas diagnósticas

Se obtuvieron muestras satisfactorias de citología y ecografía de todos los animales del estudio. Mientras que, en la endoscopia, se obtuvieron imágenes aptas para analizar en 27 animales. La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos en los animales objeto del estudio, utilizando cada una de las técnicas de diagnóstico. Mediante la primera prueba diagnóstica, la videoendoscopia, en 24 vacas no se observó secreción, frente a 3 en las que sí. En cuanto a la inflamación, 10 presentaban mucosa de apariencia normal (Figura 15) y 17 de apariencia compatible con inflamación e hiperemia (Figura 16). Respecto de la ultrasonografía, y siguiendo los criterios de inflamación previamente descritos, 16 animales presentaban el lumen con un diámetro menor a 3 mm. y un grosor del endometrio menor a 8 mm. (Figura 17). Los 14 restantes presentaban ambos parámetros aumentados (Figura 18). Finalmente, mediante la citología, 14 vacas presentaban un porcentaje de polimorfonucleados neutrófilos menor al criterio descrito (Figura 19) y 16 se diagnosticaron como positivas a ES (Figura 20).

Tabla 3. Resultados de las diferentes pruebas diagnósticas.

Técnica	Medición	Normal	Alterado	Total de animales
Videoendoscopia	Secreción	24	3	27
	Inflamación	10	17	
Ecografía	Luz + pared	16	14	30
Citología	PMN N	14	16	30



Figura 15. Videoendoscopia en vaca de leche de 50 días postparto donde se observa el *portio vaginalis* del cérvix de apariencia normal.



Figura 16. Videoendoscopia a 50 días postparto en vaca de leche donde se observa el *portio vaginalis* del cérvix inflamado e hiperémico.

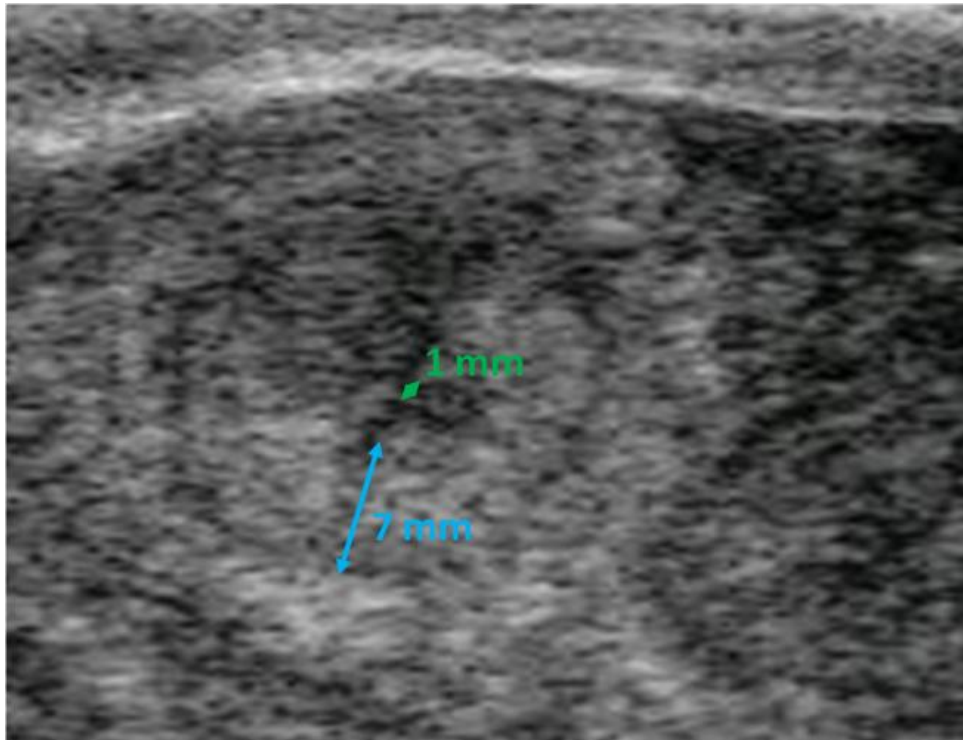


Figura 17. Ultrasonografía en vaca de leche de 50 días postparto donde se observa un corte transversal del cuerno uterino de aspecto normal; azul espesor del endometrio, verde lumen uterino.

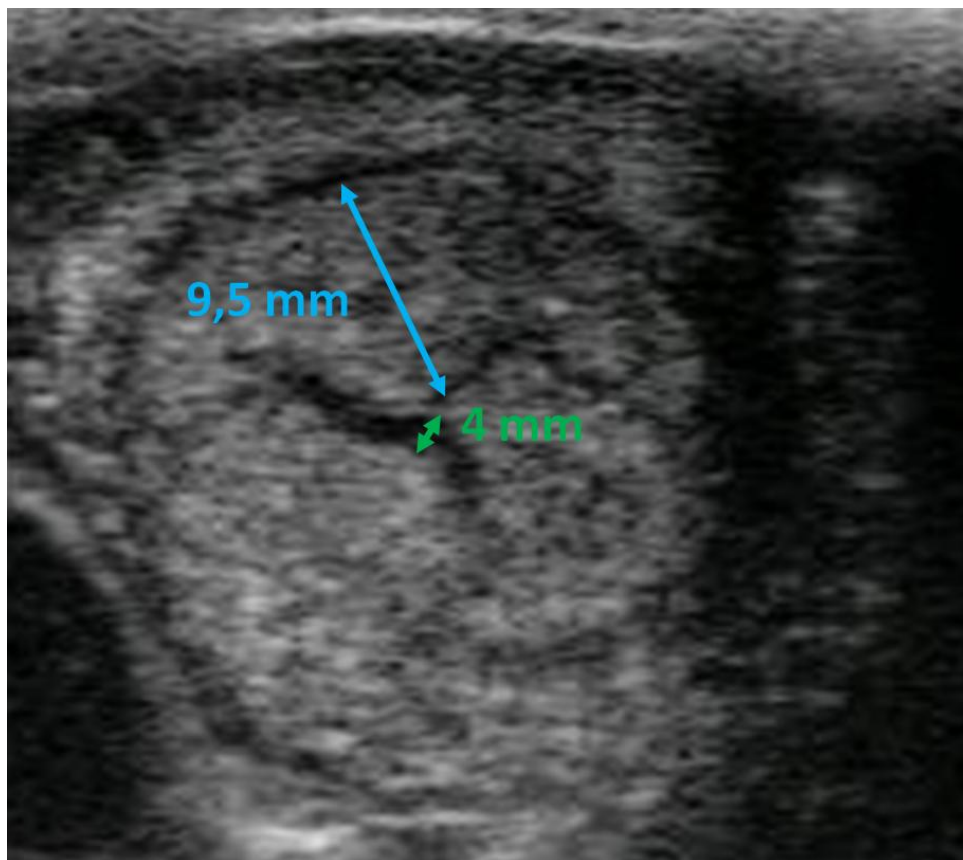


Figura 18. Ultrasonografía en vaca de leche de 50 días postparto donde se observa un corte transversal del cuerno uterino que presenta alteraciones; azul espesor del endometrio, verde lumen uterino.

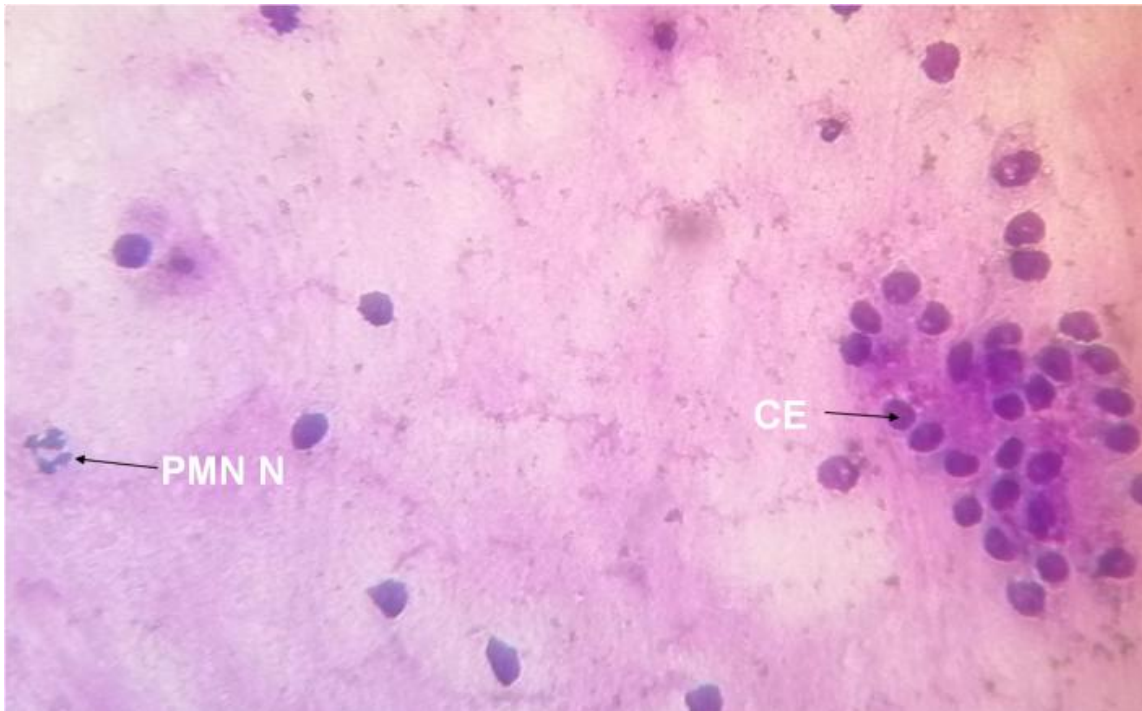


Figura 19. Citología endometrial en vaca de leche de 50 días postparto con proporción de PMN N normal (CE: Células endometriales).

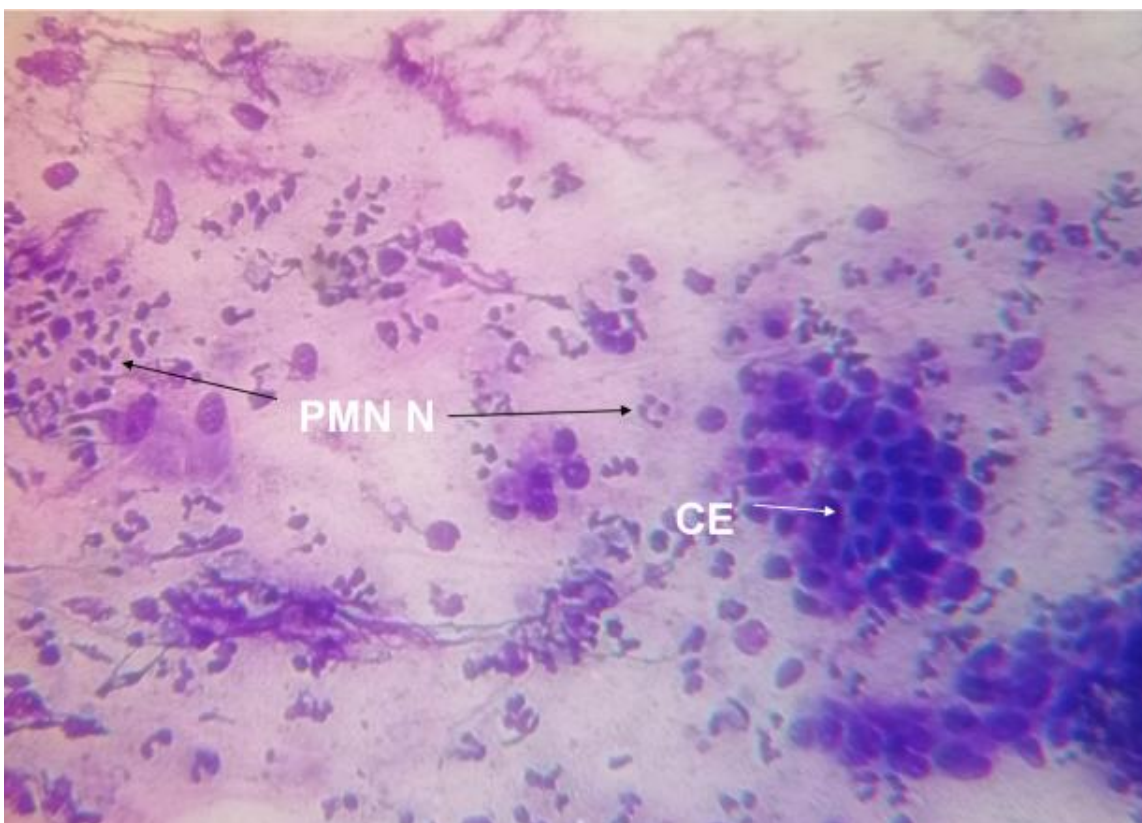


Figura 20. Citología endometrial en vaca de leche de 50 días postparto con proporción de PMN N alterada (CE: Células endometriales).

4.4. Asociación entre los distintos métodos utilizados para el diagnóstico de endometritis subclínica

En la técnica de videoendoscopia no existió relación entre las 3 variables analizadas (Secreción, Grado de inflamación y Apertura del *portio vaginalis* del cérvix) y el diagnóstico de ES mediante citología. Siendo $p=0,48$ en Secreción, $p=0,60$ en Inflamación y $p=0,50$ en Apertura del *portio vaginalis* del cérvix (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación entre las variables analizadas por citología y endoscopia (prueba exacta de Fisher).

		Secreción			Inflamación			Apertura		
		0	1	p	0	1	p	0	1	p
Citología	0	10	1	0,48	7	4	0,60	8	3	0,50
	1	14	2		3	13		7	9	

Secreción e inflamación: 0 = negativo / 1 = positivo.

Apertura cuello: 0 = cerrado / 1 = abierto.

Confrontando por separado las dos variables obtenidas por ecografía (Diámetro luminal y Grosor del endometrio) con la citología, se demuestra que en ambos casos existe una asociación (Lumen $p=0,034$ y Endometrio $p=0,05$). En el caso de tomar los dos parámetros en conjunto, no se observó una asociación entre ellos y la citología ($p=0,09$). En la Tabla 5 se compara la asociación de los animales positivos a la citología con las diferentes variables de ecografía.

Tabla 5. Comparación entre las variables analizadas por citología y ultrasonografía (prueba exacta de Fisher).

		Lumen			Endometrio			Lumen + endometrio		
		0	1	p	0	1	p	0	1	p
Citología	0	13	1	0,034	14	0	0,05	10	4	0,09
	1	3	13		4	12		5	11	

0=negativo / 1=positivo

4.5. Asociación de los antecedentes reproductivos con el diagnóstico de endometritis subclínica

Una vez organizados todos los datos de forma individual, se procedió a ver la asociación del estado reproductivo del animal con el diagnóstico de ES mediante citología.

En esta ocasión, se analizó el efecto de los antecedentes reproductivos del animal con la aparición de endometritis subclínica diagnosticada por citología. Para las variables Días postparto, Número de partos y Abortos previos, no se observó asociación ($p=0,63$, $p=0,21$, $p=0,89$, respectivamente). La única que presentó asociación fue la variable Patologías ($p=0,049$) (Tabla 6).

Tabla 6. Asociación entre la citología y los antecedentes reproductivos (prueba exacta de Fisher).

		Días postparto						Nº partos						Aborto previos		Patologías	
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	0	1	0	1
Citología	0	1	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	3	0
	1	7	5	4	6	1	4	7	5	5	9	0	1	22	5	19	8
p		0,63						0,21						0,89		0,049	

Días postparto: 1=31 al 35, 2=36 al 40, 3=41 al 45, 4=46 al 50, 5=51 al 55, 6= Más de 55

Citología: 0=negativo / 1=positivo

Abortos y patologías: 0=ausencia / 1=presencia

5. Discusión

La vaca Holstein Friesian ha visto aumentada su producción lechera en los últimos cuarenta años, debido a una combinación de varios factores. Asimismo, se han estudiado diferentes patologías que interfieren en el desarrollo de un correcto ciclo reproductivo (1). En el bovino de leche, uno de los problemas más comunes que causan graves pérdidas económicas es la endometritis subclínica (49). Por ello, es necesario diagnosticar esta patología para evitar, entre otras cosas, el aumento del intervalo parto-cubrición (18).

La herramienta más utilizada para el diagnóstico y determinación de prevalencia de ES ha sido la citología endometrial obtenida mediante cepillo endocervical ginecológico (36). La prevalencia de ES varía entre las distintas investigaciones y los distintos lugares geográficos del 2% al 51% (8,19,25,28).

En un estudio realizado en 141 vacas de leche Gilbert *et al.* (4), informaron una prevalencia entre los 40 y 60 días postparto del 53%. Para ello, hicieron un primer examen citológico y clasificaron los animales de manera subjetiva en función de la cantidad de PMN N vistos (sin contar) en el preparado. Posteriormente, evaluaron el porcentaje de PMN N tomando como punto de corte valores cercanos al 5% aproximadamente.

Por otro lado, Kasimanickam *et al.* (25), realizaron su estudio en 228 vacas Holstein Friesian mediante exámenes de citologías endometriales obtenidas con Cytobrush® y establecieron una prevalencia de ES de 41% a 51% entre los 20 y 47 del postparto. Asimismo, Bogado *et al.* (8), establecieron una prevalencia 27,8% en 32 vacas Holstein Friesian con más de 60 días postparto. En este caso, los resultados informados por estos autores fueron obtenidos mediante una combinación de muestras citológicas e histopatología.

La población animal en la que se ha realizado el presente estudio, fueron hembras postparto que tenían programada la revisión la semana en la que se realizó el trabajo. Los resultados de prevalencia indicaron que el 53,3% del total de animales muestreados, entre el día 31 a 61 del postparto, fueron positivos a ES. Este valor es similar al obtenido por Gilbert *et al.* (4). Es menester destacar que, en nuestro caso, el número de animales estudiados fue de 30. Por ello, la diferencia en el valor de prevalencia obtenida en comparación con los estudios anteriores (8,25), podría deberse al bajo número de animales evaluados.

Por otro lado, existen distintas pruebas para el diagnóstico de esta patología que incluyen el lavado uterino, la vaginoscopia y la biopsia endometrial (13,29,35). En el presente

estudio no se han tenido en cuenta estas herramientas por diferentes razones que se detallan a continuación. En relación al lavado uterino y las biopsias, aunque ofrecen mucha información, no permiten obtener los resultados inmediatos en condiciones de campo, además de suponer un mayor coste (35). Asimismo, en lugar de utilizar la vaginoscopia, que en estudios anteriores se informó que no era útil para diagnosticar ES en bovinos, se ha utilizado la videoendoscopia, no descrita en vacuno hasta el momento.

Mediante la videoendoscopia, se puede visualizar la parte caudal del tracto reproductor femenino. Hasta el presente no se ha descrito la utilización de esta técnica para la determinación de ES en bovino de leche. Sin embargo, Barlund *et al.* (35) y Drillich *et al.* (46) informaron sobre la utilización de la vaginoscopia para el diagnóstico de endometritis clínica y subclínica, mediante la observación de la presencia o ausencia de secreción en el *portio vaginalis* del cérvix. En el presente estudio, la videoendoscopia evaluó la presencia de secreción, el grado de inflamación y apertura del *portio vaginalis* del cérvix. Por todo ello, tanto la videoendoscopia como la vaginoscopia resultaron útiles para observar la presencia y tipo de secreción y el aspecto de la mucosa, pero fueron limitadas para el diagnóstico de ES.

Respecto de la ecografía, ha quedado demostrado que es una herramienta muy utilizada en la reproducción animal. Para hacer un correcto uso de este instrumento, hay que tener en cuenta, que la involución del útero y el cuello uterino no se completan hasta aproximadamente el día 30 después del parto (18). Asimismo, es importante recordar el momento del ciclo estral en el que se encuentre el animal (35). Por lo tanto, el diagnóstico de ES en el postparto de las vacas mediante ecografía, debe realizarse después de este periodo (34) y descartar animales que se encuentren en proestro, estro o metaestro (48). En el presente estudio, el total de animales incluidos, se encontraban entre los 31 y 61 días postparto y, previo a la toma de imágenes de los cuernos uterinos, se observaron los ovarios para valorar la existencia o no de patologías.

Del mismo modo, para la evaluación de las imágenes ecográficas se utilizaron dos variables, el diámetro luminal uterino y el grosor del endometrio. Es importante tener en cuenta que la correcta medición de las estructuras depende del tipo de movimiento del cursor (teclas, almohadilla o bola), la calidad de imagen, el equipo, tipo de sonda y frecuencia utilizada y la habilidad del examinador (34). Al tratarse de una escala de medida muy pequeña (milímetros), un leve desajuste, una imagen mal tomada (borrosa) puede pasar de una medición negativa a positiva o viceversa.

Barlund *et al.* (35), realizaron una evaluación por ultrasonografía (Sonovite vet 180 plus) a 221 animales entre el día 25 y 200 del postparto, dando positivos aquellos que tuvieran el diámetro luminal y el grosor del endometrio aumentado en más de 3 mm. y 8 mm. respectivamente. Siguiendo este criterio, en el presente estudio fueron evaluados como positivos, un porcentaje mayor de animales (53,3% vs. 24,8%). Teniendo en cuenta unas prestaciones similares en ambos equipos de ultrasonido, la diferencia de este resultado podría deberse al número de animales evaluados en cada estudio.

Por otro lado, otros autores (25,48), utilizaron un criterio subjetivo para diagnosticar la ES y solo tuvieron en cuenta presencia o no de líquido en el lumen uterino, sin evaluar el grosor del endometrio. Kasimanickam *et al.* (25), realizaron el estudio en 228 vacas de leche entre los 20 y 47 días postparto. El criterio utilizado por estos autores para diagnosticar como positivas a ES a las vacas del estudio se basó en la presencia o ausencia de líquido en el lumen uterino. Asimismo, compararon los resultados del incremento del lumen uterino con los resultados obtenidos con la citología, determinando que existía relación entre ambas variables. Por otra parte, Lenz *et al.* (48), realizaron el estudio en 324 vacas de leche que se encontraban entre los días 21 y 27 del postparto. En este trabajo previo, los animales se diagnosticaron como positivos a ES cuando el lumen uterino fue mayor a 2 mm. Si tomamos únicamente el lumen como criterio objetivo de evaluación de ES en el presente trabajo, hemos evaluado como positivas aquellas vacas con un lumen mayor a 3mm. A pesar del criterio de mayor tamaño del diámetro del lumen uterino y la objetividad del método empleado, los resultados obtenidos fueron similares a los informados anteriormente.

Como se ha descrito en estudios anteriores, el método más utilizado para el diagnóstico de ES, ha sido la citología (4,11,22,25,26). Con esta técnica es posible obtener células representativas y bien conservadas de la superficie endometrial sin dañar el tracto reproductivo (25). A pesar de ello, no se han establecido valores de corte de PMN N comunes en función de los días postparto. Comparando los puntos de corte para el valor de PMN N descritos en los estudios anteriores (22,25,28,40), se observó una diversidad de valores. Esto puede deberse a que, a lo largo del tiempo, variaron los criterios de inflamación.

En el presente estudio, se han seguido los criterios descritos en 2013 por Madoz *et al.* (22), para la evaluación de las citologías, debido a que apenas han cambiado en los últimos años. De este modo, se examinaron 30 vacas entre 31 y 61 días postparto y el rango de PMN N utilizado para clasificar animales como positivo fue: $\geq 8\%$ PMN N en los días 21 al 33 del

postparto, $\geq 6\%$ del 34 al 47 día postparto y $\geq 4\%$ del 48 al 62 día postparto. Pese a que en ambos trabajos se utilizó el mismo criterio para evaluar las muestras citológicas, el porcentaje de animales valorados como positivos en el presente estudio fue superior (53,3% vs. 45%).

Sin embargo, otros autores (25,28,40) describen valores de PMN N diferentes. Kasimanickam *et al.* (25), realizaron un estudio con 228 vacas de leche entre 20 y 47 días postparto. Las muestras obtenidas con Cytobrush®, se tiñeron con colorante de Giemsa y se contabilizaron 100 células totales. En este caso, fueron evaluados como positivos aquellos animales en los que se observaban preparados con valores superiores al 18% de PMN N en los días postparto 21 y 33 y superiores al 10% entre los 34 y 47 días postparto.

Por otro lado, Dubuc *et al.* (40), examinaron a 1044 vacas Holstein Friesian y diagnosticaron como positivos a aquellos animales con un porcentaje de PMN N $>6\%$ entre los días 21 y 35 del postparto y $>4\%$ para las vacas con más de 49 días postparto.

Igualmente, Plöntzke *et al.* (28), examinaron a 201 vacas de leche entre los 21 y 49 días postparto, cuya producción media individual era de 23 litros de leche al día. Los preparados citológicos se procesaron con tinción 15 Biopur y se contaron un total de 200 células a $\times 400$. Estos autores establecieron como positivas aquellas vacas con valores superiores al 5% PMN N independientemente del número de días postparto en los que fueron tomadas las muestras.

Si comparamos las distintas técnicas utilizadas para el diagnóstico de la EC y la ES con la citología endometrial, Barlund *et al.* (35) informaron una asociación entre la vaginoscopia y la citología exclusivamente en vacas con EC. De este modo, se ha demostrado que, en caso de tratarse de ES, la vaginoscopia no es una técnica a utilizar para el diagnóstico de esta patología. Del mismo modo, en nuestro estudio, no se ha observado asociación entre la citología con las diferentes variables estudiadas por videoendoscopia (Secreción, Inflamación y Apertura *portio vaginalis* del cérvix) y la presencia de ES en bovinos de leche entre los 31 y 61 días postparto.

En cuanto a la comparación de la ultrasonografía con la citología endometrial y, tomando en conjunto las variables de diámetro del lumen uterino (3mm.) y grosor del endometrio (8mm.) para la clasificación de positivas y negativas, en el presente estudio no se observó asociación ($p=0,09$) entre estas variables y los resultados obtenidos por citología. Del mismo modo, Barlund *et al.* (35), informaron que cuando se combinaron ambos métodos, no existía asociación ($p=0,07$), aunque la sensibilidad aumentaba. Sin embargo, si evaluamos por

separado las variables diámetro del lumen y grosor del endometrio, obtenidas por ultrasonografía, hemos determinado que sí existe asociación con la citología ($p=0,034$ para el lumen uterino y $p=0,05$ para grosor del endometrio).

Por otra parte, Kasimanickam *et al.* (25) solo tuvieron en cuenta la presencia o no de líquido en el lumen uterino, e informaron que había una relación entre los resultados obtenidos y la citología endometrial. Además, también informaron que si estas herramientas de diagnóstico se usaban conjuntamente aumentaba la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico. Al igual que en el trabajo anterior, en el presente estudio existió una relación ($p=0,034$) entre el incremento del lumen uterino y el incremento en el porcentaje de PMN N en las citologías. Si bien en nuestro trabajo existió una asociación entre la ecografía y la citología, es menester destacar que en el estudio realizado por Kasimanickam *et al.* (25), el punto de corte en la proporción de PMN N fue de $>18\%$ PMN N entre los 21 y 33 días postparto y $>10\%$ entre los 34 y 47 días postparto.

En el presente estudio, hemos determinado que existe una relación entre las muestras citológicas y el incremento del tamaño del lumen uterino. En nuestro caso, las imágenes de ultrasonido fueron realizadas por el mismo operador con un ecógrafo ExaGo® provisto de una sonda de 7,5MHz. Del mismo modo, Salah *et al.* (46), compararon la citología endometrial y ultrasonografía transrectal en 53 vacas de carne evaluadas entre los días 20 y 35 postparto. En este caso, las imágenes fueron tomadas con un ecógrafo Sonosite Vet 180 Plus provisto de una sonda lineal 5MHz y los parámetros analizados fueron el diámetro del cérvix y el tamaño del lumen uterino. En coincidencia con el presente estudio y tratándose de equipos de ultrasonido con tecnologías diferentes, estos autores también informaron que existe una relación entre la citología y el incremento del lumen uterino.

En la ES existen otros factores que pueden predisponer o no, la aparición de la enfermedad. De este modo, se han estudiado como posibles elementos predisponentes el número de días postparto, el número de partos, los abortos y las patologías ováricas (17).

Analizando la variable Días postparto, otros autores (4,41) informaron que no existía una asociación con la citología y el desarrollo de ES. Gilbert *et al.* (4), examinaron mediante citología endometrial 141 vacas entre 40 y 60 días postparto. Por otra parte, Recce *et al.* (41), analizaron 152 vacas con 40 días postparto. Del mismo modo, el análisis de la variable Días postparto estudiada en el presente trabajo, ha demostrado que no hubo asociación con los resultados obtenidos por citología ($p=0,63$), al igual que en los autores descritos.

Respecto del Número de partos, Recce *et al.* (41) estudiaron a los 40 días postparto 152 vacas de leche entre 1 y 8 partos y con una producción media de 19 litros de leche por animal/día. Como conclusión, estos autores han informado que la variable Número de partos no estaba relacionada con el desarrollo de ES. En nuestro estudio se utilizaron vacas de 1 a 6 partos que se encontraban entre los 31 a 61 días postparto con una media de producción de 35,7kg/día. A pesar de las diferencias existentes en las características de los animales incluidos en nuestro estudio respecto del anterior, no hemos observado asociación ($p=0,21$) entre el número de partos la citología y la presencia de ES.

En relación a la variable Abortos previos, Adnane *et al.* (12) informaron que existía asociación con el desarrollo de endometritis subclínica. Sin embargo, en el presente estudio no se ha obtenido relación ($p=0,89$) entre la variable Abortos y el diagnóstico de ES mediante citología. Esta discrepancia podría deberse al número de animales utilizados en cada caso (5.278 vs. 30).

En último lugar, respecto a la variable Patologías, en el presente estudio se ha determinado que existe asociación ($p=0,049$) con el diagnóstico positivo a endometritis mediante citología. Del mismo modo, Karsch *et al.* (42) y Sheldon *et al.* (43), observaron una relación entre la ES y las patologías ováricas, siendo éstas consecuencia de la ES.

6. Conclusiones

1. Existe una alta prevalencia de ES en los animales objeto de estudio, que se encontraban entre el día 31 y 61 del postparto.
2. La ecografía y la videoendoscopia, no presentan asociación con la citología endometrial.
3. Las variables medidas por ecografía (diámetro del lumen uterino y grosor del endometrio) y comparadas individualmente con la citología endometrial presentan asociación.
4. La citología y la ultrasonografía endometrial podrían utilizarse en conjunto para mejorar el diagnóstico de la ES.
5. El número de partos, los días postparto y los abortos previos no se vieron relacionados con la ES.
6. La hipofuncionalidad ovárica está relacionada con la ES.

7. Bibliografía

- (1) Rinaudo A, Marini PB (dir). Endometritis subclínica en vacas lecheras: diagnóstico, tratamiento e incidencia productiva y reproductiva [tesis doctoral]. [Casilda]: Universidad nacional del Rosario; 2012.
- (2) Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod. Dom. Anim.* 2009;44(3):1-9.
- (3) Vallejo Timarán DA, Chaves Velásquez CA, Astaíza Martínez JM, Benavides Melo CJ, Jurado Ojeda XE. Endometritis subclínica diagnosticada mediante cytobrush y comportamiento reproductivo en vacas del municipio de Pupiales, Colombia. *Rev Med Vet.* 2014;(27):111-120.
- (4) Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat N. Subclinical endometritis. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology.* 2005;64:1879-88.
- (5) Barrio M, Vigo M, Quintela L, Becerra JJ, García-Herradón P, Martínez D, et al. Influence of subclinical endometritis on the reproductive performance of dairy cows. *INIA.* 2015;13(4):e05SC02.
- (6) Elliott L, McMahon KJ, Gier HT, Marion GB. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am. J. Vet. Res.* 1968;29:77-81.
- (7) Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2004a;82-83:295-306.
- (8) Bogado O, Opsomer G. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del postparto uterino en vacas lecheras: una revisión con énfasis en la endometritis subclínica. *Compend. Cienc. Vet.* 2017;7(1):29-40
- (9) Azawi OI. Review Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci.* 2008;105:187-208.
- (10) Foldi J, Kulcsar M, Pecsí A, Huyghe B, De Sa C, Lohuis J.A.C.M, Cox P, Huszenicza Gy. Bacterial complications of postpartum uterine in cattle. *Anim Reprod Sci* 2006;96:265-281.

- (11) Palmer C. Postpartum uterine infection. En: Hopper R. Bovine reproduction. 1a ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell; 2015. p. 440-448.
- (12) Adnane M, Kaidi R, Hanzen C, England G. Risk factors of clinical and subclinical endometritis in cattle: a review. Turkish journal of veterinary and animal sciences. 2017;41:1-11.
- (13) Quintela Arias LA, Vigo Fernández M, Becerra González JJ, Barrio López M, García Herradón PJ y Peña Martínez AI. Subclinical Endometritis in Dairy Cattle. En: Rita Payan-Carreira. 1a ed. New Insights into Theriogenology. Londres: IntechOpen; 2018: 79-97.
- (14) Painemilla V, Omar M, Hernán M (dir.) Incidencia de endometritis subclínica en vacas vacías al diagnóstico de preñez [Trabajo final de grado]. [Tandil]: Facultad de ciencias veterinarias UNCPBA; 2018.
- (15) Singh J, Murray R.D, Mshelia G, Woldehiwet Z. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. The Veterinary Journal 2008; 175: 301-309.
- (16) Sheldon IM, Dobson H. Postpartum uterine health in cattle. Anim Repro Sci. 2004b; 82-83:295-306.
- (17) Sheldon IM, Owens S. Postpartum uterine infection and endometritis in dairy cattle. Animal Reproduction. 2017;14(3):622-629.
- (18) Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc SJ, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology. 2006; 65(8):1516-1530.
- (19) Sheldon IM, Cronin JG, Bromfield JJ. Tolerance and innate immunity shape the development of postpartum uterine disease and the impact of endometritis in dairy cattle. Anim. Biosci. 2019;7:11.1-11.24
- (20) LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. J Dairy Sci. 2002;85:2223-36.
- (21) Molina-Coto R, Lucy M. Uterine inflammation affects the reproductive performance of dairy cows: A review. Agron. Mesoam. 2018; 29(2):449-468

- (22) Madoz L, Giuliadori M, Jaureguiberry M, Plöntzke J, Drillich M, de la Sota R. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2013;96(7):4333-4339.
- (23) Barajas JL, Hernández J, García A, Martínez E, Juárez NO, Bedolla MA, Luzbel R. Endometritis subclínica y tasa de gestación en vacas lecheras en México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 2018;9(1):135-146
- (24) Hill, J. y Gilbert. R. Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust Vet J*, 2008; 86(8):312-6.
- (25) Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2004;62,9-23.
- (26) Madoz LV, Ploentzke J, Albarracin D, Mejia M, Drillich M, Heuwieser W, De LaSota RL. Prevalence of clinical and subclinical endometritis in dairy cows and the impact on reproductive performance. 16th International Congress on Animal Reproduction, Budapest, Hungary 2008; p.51.
- (27) Green MP, Ledgard AM, Beaumont SE, Berg MC, McNatty KP, Peterson AJ, Back PJ. Long-term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *J. Anim Sci*, 2011; 89(11):3551-3560.
- (28) Plöntzke J, Madoz LV, de la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W. Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Anim Reprod Sci*, 2010;122:52-57.
- (29) Wagener K, Gabler C, Drillich M. A review of the ongoing discussion about definition, diagnosis and pathomechanism of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*. 2017;94:21-30.
- (30) Königsson K, Savoini G, Govoni N, Invernizzi G, Prandi A, Kindahl H et al. Energy balance, leptin, NEFA and IGF-I plasma concentrations and resumption of post partum ovarian activity in swedish red and white breed cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2008;50(1):3.

- (31) De la Sota R. Manejo reproductivo en rodeos de leche. 1ª ed. Córdoba, Argentina: Instituto de Reproducción Animal de Córdoba; 2006. p. 105-137.
- (32) Santos NR, Lamb GC, Brown DR, Gilbert RO. Postpartum endometrial cytology in beef cows. *Theriogenology*. 2009;71:739-745.
- (33) Ricci A, Gallo S, Molinaro F, Dondo A, Zoppi S, Vincenti L. Evaluation of subclinical endometritis and consequences on fertility in Piedmontese beef cows. *Reprod Domest Anim*. 2015;50:142-148.
- (34) Polat B, Cengiz M, Cannazik O, Colak A, Oruc E, Altun S et al. Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis. *Animal Reproduction Science*. 2015;155:50-55.
- (35) Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW, A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology*. 2008;69:714-723.
- (36) Madoz L, Jaureguiberry M, Migliorisi AL, De la sota R. Changes in endometrial cytology during the estrous cycle in dairy cows. *Cs Morfol*. 2016;18(1):34-41.
- (37) Lopdell T, Berg MC, Green MP, Back PJ. Effect of sub-clinical uterine infection on plasma aminoacid concentrations in early lactation dairy cows. *Proc NZ Soc Anim Prod*. 2011;71:291-295
- (38) Heidarpour M, Mohri M, Fallah Rad AH, Shahreza FD, Mohammadi M. Acute-phase protein concentration and metabolic status affect the outcome of treatment in cows with clinical and subclinical endometritis. *The Veterinary Record*. 2012;171:1-5.
- (39) Kaufmann T, Drillich M, Tenhagen B-A, Heuwieser W. Correlations between periparturient serum concentrations of non-esterified fatty acids, beta-hydroxybutyric acid, bilirubin, and urea and the occurrence of clinical and subclinical postpartum bovine endometritis. *BMC Veterinary Research*. 2010;6:47.
- (40) Dubuc J, Duffield T, Leslie K, Walton J, LeBlanc S. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2010;93(11):5225-33.
- (41) Recce S, Russi N, Massera A, Signorini M. Identificación de Factores de Riesgos Asociados a la Presentación de Endometritis en Bovinos Lecheros. *Avances en Ciencias Veterinarias*. 2014;29:23-28.

(42) Karsch F, Battaglia D, Breen K, Debus N, Harris T. Mechanisms for Ovarian Cycle Disruption by Immune/inflammatory Stress. *Stress*. 2002;5(2):101-112.

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

(44) Lindsay F. The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy. *Journal of Small Animal Practice*. 1983;24(1):1-15.

(45) Klaus-Dieter Budras, Robert E. Habel, Paul R. Greenough, Christoph K.W, Mülling, editores. *Bovine anatomy*. 2da edición. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG; 2011.

(46) Drillich M, Kaufmann T, Raab D, Lenz M, Heuwieser W. Comparison of new techniques for the diagnosis of chronic endometritis in dairy cattle. In: Poster abstract, the proceedings of the World Buiatrics Congress; 2004;42.

(47) Salah N, Yimer N. Cytological endometritis and its agreement with ultrasound examination in postpartum beef cows. *Veterinary World*. 2017;10(6):605-609.

(48) Lenz M, Drillich M, Heuwieser W. Evaluierung der Diagnostik subklinischer Endometritiden mittels Ultraschall beim Rind. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2007;120(5-6):237-44.

(49) Brodzki P, Brodzki A, Kostro K, Kurek Ł, Marczuk J, Krakowski L. Cytological image of the endometrium in cows in follicular and luteal phases of the ovarian cycle and in cows with follicular and luteal ovarian cysts. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2014;58(1):141-147.

(50) De Boer MW, LeBlanc SJ, Dubuc J, Meier S, Heuwieser W, Arlt S, Gilbert RO, McDougall S. Invited review: Systematic review of diagnostic tests for reproductive tract infection and inflammation in dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014;97: 3983-99.

(51) National Research Council (NRC). *Nutrient requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Washington, DC., USA. National Academy Press, 2001.