

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS DE GRADO PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TEMA:

“DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACONAS MESTIZAS VACÍAS, DE 45 DÍAS POST INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, MEDIANTE CYTOBRUSH EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN, POSTGRADO Y CONSERVACIÓN AMAZÓNICA (CIPCA), CANTÓN CARLOS JULIO AROSEMENA TOLA, PROVINCIA DE NAPO”

AUTOR:

Joffre Javier Masaquiza Aragón

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

Latacunga – Ecuador

Junio 2015

AUTORÍA

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

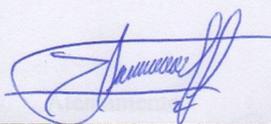
Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera en Medicina Veterinaria

DECLARACIÓN DEL AUTOR

“La responsabilidad del contenido de esta investigación, el análisis realizado, las conclusiones y recomendaciones de la presente tesis pertenece única y exclusivamente al autor: JOFFRE JAVIER MASAQUIZA ARAGÓN; y el patrimonio intelectual de la misma a la UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”.

(Reglamento de Graduación de la U.T.C).



Joffre Javier Masaquiza Aragón
C.I. 160045740-0

postulante Joffre Javier Masaquiza Aragón, con el tema de Tesis:
"DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACONAS
MESTIZAS VACÍAS, DE 45 DÍAS POST INSEMINACIÓN ARTIFICIAL,
MEDIANTE CYTOBRUSH EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN,
POSTGRADO Y CONSERVACIÓN AMAZÓNICA (CIPCA), CANTÓN

CERTIFICACIÓN

Cumpliendo con el Reglamento del Curso Profesional de la Universidad
Técnica de Cotopaxi, en calidad de Director de Tesis con el Tema
"DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACONAS
MESTIZAS VACÍAS, DE 45 DÍAS POST INSEMINACIÓN ARTIFICIAL,
MEDIANTE CYTOBRUSH EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN,
POSTGRADO Y CONSERVACIÓN AMAZÓNICA (CIPCA), CANTÓN
CARLOS JULIO AROSEMENA TOLA, PROVINCIA DE NAPO", propuesto por
el egresado Joffre Javier Masaquiza Aragón, presento el Aval Correspondiente de
este trabajo de tesis.

Dra. Mg. Xavier Cristóbal Quispe Mendoza

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Atentamente,

Dra. Rafael Garzón Jarrín

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

DIRECTOR DE TESIS

AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Nosotros, en calidad de miembros del tribunal de grado aprobamos el presente informe de investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi y U. A. CAREN por cuanto, el postulante Joffre Javier Masaquiza Aragón, con el tema de Tesis: "DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACONAS MESTIZAS VACÍAS, DE 45 DÍAS POST INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, MEDIANTE CYTOBRUSH EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN, POSTGRADO Y CONSERVACIÓN AMAZÓNICA (CIPCA), CANTÓN CARLOS JULIO AROSEMENA TOLA, PROVINCIA DE NAPO", han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúnen los méritos suficientes.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa Institucional.

Atentamente,

Dra. Mg. Xavier Cristobal Quishpe Mendoza

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dra. Rafael Garzón Jarrín

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Edwin Orlando Pino Panchi

MIEMBRO OPOSITOR DEL TRIBUNAL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por darme vida y salud, la sabiduría necesaria para la culminar mis estudios profesionales, por la bendición de haberme puesto en mi camino una gran esposa e hija que me llenaron de felicidad y dicha hasta los momentos más difíciles, pero que supimos levantarnos como familia y seguir adelante, para ahora obtener este gran triunfo para nuestras vidas.

A mis queridos madre y padre, por todo lo que me han dado en cada etapa de mi vida y quienes con su sabiduría en el temor a Dios supieron guiarme con sus sabios consejos de lucha, superación y perseverancia para hacer de mí la persona que hoy soy, y a toda mi familia quienes confiaron en mí, y me brindaron su apoyo.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, que ha sido mi segundo hogar durante todos estos años de Carrera Profesional, a sus autoridades y a todos mis profesores por todas sus enseñanzas y conocimientos impartidos, que han sido una clave fundamental para ser un buen profesional. A mi Director de Tesis Dr. Miguel Gutiérrez por su acertada dirección y disposición de ayudarme en el presente trabajo.

Hago extensiva mi especial gratitud a la Universidad Estatal Amazónica, al Centro de Investigación, Postgrado y Conservación Amazónica (CIPCA), por abrirme sus puertas para la realización del presente trabajo. En particular al Centro Latinoamericano de Estudios de las Problemáticas lecheras (CLEPL), al Dr. Pablo Marini PhD, Dr. Roberto Quinteros, Dr. Juan Carlos López e Ing. Juan Carlos Moyano por todo su valioso aporte, apoyo, colaboración y paciencia no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como profesional.

Y todas las personas que de una u otra manera colaboraron en la realización del presente trabajo.

Joffre Javier Masaquiza Aragón

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por el don de la vida y la oportunidad de obtener este triunfo junto a mis seres queridos.

A mi esposa Mayra y especialmente a mi hija Sarita, quienes han sido mi soporte y mi refugio de felicidad, dándome el impulso necesario para culminar este trabajo que ha demandado de gran sacrificio y constancia, pero que a pesar de todo ha sido una gran bendición alcanzar ésta meta para nuestras vidas.

A mis queridísimos madre y padre por sus sabios consejos, por brindarme su cariño y apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida, pero sobre todo la gran paciencia y confianza que depositaron en mí, para alcanzar esta meta.

Joffre Javier Masaquiza Aragón

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO BOVINO.....	1
1.1.1. <i>Genitales externos</i>	2
1.1.2. <i>Genitales internos</i>	2
1.1.3. <i>Ciclo estral</i>	5
1.1.4. <i>Fisiología del ciclo estral</i>	6
1.1.5. <i>Modificaciones histológicas durante el ciclo estral</i>	7
1.1.6. <i>Tejido del útero</i>	8
1.1.7. <i>Inmunología uterina</i>	10
1.2. ENDOMETRITIS.....	11
1.2.1. <i>Clasificación</i>	12
1.2.2. <i>Endometritis subclínica</i>	12
1.3. CYTOBRUSH.....	16
1.3.1. <i>Definición</i>	17
1.4. CULTIVO.....	19
1.5. ANTIBIOGRAMA.....	21
CAPÍTULO II.....	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1. Ubicación de la investigación.....	23
2.2. Recursos.....	24
2.2.1. <i>Recursos humanos</i>	24
2.2.2. <i>Materiales de oficina</i>	24
2.2.3. <i>Insumos</i>	25
2.2.4. <i>Equipos</i>	26
2.3. Tipo de investigación	26
2.3.1. <i>Investigación descriptiva</i>	26

2.3.2. <i>Investigación explicativa</i>	27
2.4. Metodología	27
2.4.1. <i>Métodos</i>	27
2.4.2. <i>Técnicas</i>	28
2.5. Análisis estadístico	28
2.5.1. <i>Unidad de estudio</i>	29
2.6. Manejo del ensayo	29
CAPÍTULO III	32
3. ANÁLISIS Y RESULTADOS	32
3.1. Resultados obtenidos de la inseminación artificial a tiempo fijo	32
3.2. Resultados del conteo de células PMN n y células epiteliales, en las dos tomas de muestras por Cytobrush (CB)	33
3.3. Resultados de la prevalencia de endometritis en las dos tomas de muestras por Cytobrush (CB)	34
3.4. Interpretación de los resultados obtenidos de los animales observados y esperados para la prueba del chi cuadrado al 5%	36
3.5. Interpretación de los resultados obtenidos en la prueba del chi cuadrado al 5%	38
3.6. Interpretación del cultivo de la primera toma de muestras por Cytobrush (CB)	39
3.7. Interpretación del cultivo de la segunda toma de muestras por Cytobrush (CB)	41
3.8. Interpretación del antibiograma realizado a partir del Cytobrush	42
CONCLUSIONES	43
RECOMENDACIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46
ANEXOS	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. Representación del aparato reproductor de la hembra	1
GRÁFICO 2. Ejemplos descarga uterina	12
GRÁFICO 3. Representación de corte histológico transversal utero	13
GRÁFICO 4. Pistola Cytobrush	19
GRÁFICO 5. Cultivo sólido (agar Mcconkey)	20
GRÁFICO 6. Antibiograma Disco Placa	22
GRÁFICO 7. Ubicación del CIPCA	24
GRÁFICO 8. Prevalencia de endometritis en las dos tomas de muestras por Cytobrush	34
GRÁFICO 9. Comparación del porcentaje de endometritis subclínica vs endometritis clínica	35
GRÁFICO 10. Animales observados y esperados para la prueba del chi cuadrado al 5%.....	37
GRÁFICO 11. Resultados obtenidos de la prueba del chi cuadrado al 5%	38
GRÁFICO 12. Cultivo de la primera toma de muestras por Cytobrush	40
GRÁFICO 13. Cultivo de la segunda toma de muestras por Cytobrush	41

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. Ventajas y desventajas de 5 técnicas utilizadas para el diagnóstico de endometritis.....	19
CUADRO 2. Conteo de células Polimorfonucleares neutrófilos y células epiteliales, en las dos tomas de muestras por Cytobrush.....	33
CUADRO 3. Resultados obtenidos de los animales observados para la prueba del chi cuadrado al 5%.....	35
CUADRO 4. Resultados obtenidos de los animales esperados para la prueba del chi cuadrado al 5%.....	36
CUADRO 5. Resultados obtenidos en la prueba del chi cuadrado al 5%.....	37
CUADRO 6. Cultivo de la primera toma de muestras por Cytobrush.....	39
CUADRO 7. Cultivo de la segunda toma de muestras por Cytobrush.....	40
CUADRO 8. Resultados del antibiograma realizado a partir del Cytobrush.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO N° 1.** Cultivo y antibiograma de muestras recolectadas por Cytobrush.
- ANEXO N° 2.** Vaconas utilizadas para el trabajo de investigación
- ANEXO N° 3.** Chequeo ginecológico, bajo la supervisión del Dr. Roberto Quinteros, responsable Programa Bovino UEA
- ANEXO N° 4.** Sincronización de celo, utilizando el protocolo Crestar®
- ANEXO N° 5.** Inseminación artificial a tiempo fijo
- ANEXO N° 6.** Diagnóstico de preñez por ecografía 45 días post inseminación artificial, realizado por Dr. Juan Carlos López (UEA)
- ANEXO N° 7.** Técnica Cytobrush
- ANEXO N° 8.** Frotis Cytobrush, bajo la supervisión del Dr. Pablo Marini, PhD (Universidad Nacional del Rosario, Argentina)
- ANEXO N° 9.** Realizando la tinción de placas, obtenidos por la técnica de Cytobrush. Tinción 15 (Biopur)
- ANEXO N°10.** Conteo de PMN n, de placas obtenidas por la técnica de Cytobrush
- ANEXO N° 11.** Microfotografía óptica. 40x. Tinción 15. Frotis obtenido por Cytobrush. Se observan células epiteliales del endometrio
- ANEXO N° 12.** Microfotografía óptica. 40x. Tinción 15. Frotis obtenido por Cytobrush. Se observan células Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN n)
- ANEXO N° 13.** Microfotografía óptica. 100x. Tinción 15. Frotis obtenido por Cytobrush. Se observan células Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN n)
- ANEXO N° 14.** Visita del tribunal
- ANEXO N° 15.** Equipo de trabajo

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ES: endometritis subclínica

EC: endometritis clínica

CB: cytobrush

UEA: Universidad Estatal Amazónica

CIPCA: Centro de Investigación, Postgrado y Conservación Amazónica

PMN: polimorfonucleares

PMN n: polimorfonucleares neutrófilos

% PMN n: porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos

IA: inseminación artificial

IATF: inseminación artificial a tiempo fijo

LH: hormona luteinizante

FSH: hormona folículo estimulante

CE: cipionato de estradiol

PG2 α : prostaglandina dos alfa

UI: unidades internacionales

IM: Intramuscular

“DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACONAS
MESTIZAS VACÍAS, DE 45 DÍAS POST INSEMINACIÓN ARTIFICIAL,
MEDIANTE CYTOBRUSH EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN,
POSTGRADO Y CONSERVACIÓN AMAZÓNICA (CIPCA), CANTÓN CARLOS
JULIO AROSEMENA TOLA, PROVINCIA DE NAPO”

RESUMEN EJECUTIVO

La presente investigación tiene por objetivo diagnosticar endometritis subclínica en vaconas mestizas mediante la técnica de Cytobrush. Se seleccionaron 38 animales, los que fueron sincronizados mediante un protocolo de IATF (CRESTAR), a los 45 días post inseminación artificial se realizó el diagnóstico de preñez mediante ecografía. Los individuos reportados como no gestantes, se sometieron al protocolo de Cytobrush (citología endometrial), las muestras se enviaron al laboratorio para realizar cultivo y antibiograma. Luego los animales que no gestaron fueron sometidos a un tratamiento diferenciado de acuerdo al antibiograma reportado, (antibiótico (IM) + flunixin meglumine (IM) por 3 días consecutivos). Seguidamente se realizó nuevamente el mismo procedimiento anterior con las vaconas que se sometieron al tratamiento. El análisis estadístico aplicado fue el chi cuadrado que es una prueba estadística no paramétrica. En la primera toma de muestras por Cytobrush la prevalencia de endometritis de un total de 38 vaconas es del 36,8%, de los cuales 28,6% corresponden a endometritis subclínica y el 71,4% corresponden a endometritis clínica. Sin embargo en la segunda toma de muestras por Cytobrush, post tratamiento, de un total de 14 vaconas el 50% corresponde a endometritis, de los cuales el 71,4% a endometritis subclínica y el 28,6% a endometritis clínica. Concluyendo así, que el grado de inflamación va en función del número de Polimorfonucleares neutrófilos sobre las células epiteliales presentes en el endometrio (células residentes normales). Respecto a los resultados de laboratorio, el primer cultivo, revelan la presencia de microorganismos Streptococcus gama hemolíticos, Staphylococcus aureus, Cándida Álbicans, Bacillus spp, Streptococcus agalactiae

(beta hemolíticos), Coliformes, Enterococcus faecalis, E. Coli y Streptococcus aureus; y el segundo cultivo, nos muestra que hay la presencia de microorganismos Streptococcus gama hemolíticos, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus spp, Coliformes, Streptococcus agalactiae (beta hemolíticos) y Acinetobacter spp.

Palabras clave: Vaconas, Endometritis, Citología endometrial, Prevalencia, Microorganismos, Tratamiento.

"DIAGNOSTIC OF SUBCLINICAL ENDOMETRITIS IN COWS CROSSBRED
NONPREGNANT, 45 DAYS POST ARTIFICIAL INSEMINATION,
CYTOBRUSH THROUGH IN THE CENTRO DE INVESTIGACIÓN,
POSTGRADO Y CONSERVACIÓN AMAZÓNICA (CIPCA), CANTÓN CARLOS
JULIO AROSEMENA TOLA, NAPO PROVINCE"

This research intended to diagnose subclinical endometritis in crossbred cows by Cytobrush technique. 38 animals, which were synchronized using a fixed time artificial insemination (CRESTAR protocol), 45 days after artificial insemination pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography an selected sample. Individuals reported as nonpregnant underwent the protocol cytobrush (endometrial cytology), samples were sent to the laboratory analysis and sensitivity. Then the animals were not gestated underwent different treatment according to antibiogram reported (antibiotic (IM) + flunixin meglumine (IM) for 3 consecutive days). Following the same procedure with young cows that underwent to the last treatment. The statistical analysis used was χ^2 is a nonparametric statistical test. In the first sampling by the prevalence of endometritis Cytobrush a total of 38 young cows from 36.8%, of which ones 28.6% are subclinical endometritis and 71.4% were clinical endometritis. However in the second sampling by Cytobrush, post treatment, of a total of 14 cows 50% is endometritis, of which 71.4% of subclinical endometritis and 28.6% for clinical endometritis. Regarding laboratory results, the first laboratory analysis, reveal the presence of microorganisms range hemolytic Streptococcus, Staphylococcus aureus, Candida albicans, Bacillus spp, Streptococcus agalactiae (beta-hemolytic), Coliforms, Enterococcus faecalis, E. coli and Streptococcus aureus; and the second laboratory analysis, shows that there is the presence of microorganisms range hemolytic Streptococcus, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Bacillus spp, Coliforms, Streptococcus agalactiae (beta-hemolytic) and Acinetobacter spp. And concluding swelling grade is a function of

the number of polymorphonuclear neutrophils on epithelial cells present in the endometrium (normal resident cells).

Key words: Young cows, Endometritis, endometrial cytology, Prevalence, Microorganisms, Treatment.



Universidad
Técnica de
Cotopaxi

CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro Cultural de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal CERTIFICO que: La traducción del resumen de tesis al Idioma Inglés presentado por el Señor Egresado de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales: **JOFFRE JAVIER MASAQUIZA ARAGÓN**, cuyo título versa **“DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA EN VACONAS MESTIZAS VACÍAS, DE 45 DÍAS POST INSEMINACIÓN ARTIFICIAL, MEDIANTE CYTOBRUSH EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN, POSTGRADO Y CONSERVACIÓN AMAZÓNICA (CIPCA), CANTÓN CARLOS JULIO AROSEMENA TOLA, PROVINCIA DE NAPO”**, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer uso del presente certificado de la manera ética que estimaren conveniente.

Latacunga, 04 de junio del 2015

Atentamente,


Lic. Marcelo Pacheco Pruna
DOCENTE CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS
C.I. 0502617350

www.utc.edu.ec

Av. Simón Rodríguez s/n Barrio El Ejido /San Felipe. Tel: (03) 2252346 - 2252307 - 2252205

PROBLEMATIZACIÓN

A nivel mundial la eficiencia productiva de cualquier sistema de ganadería siempre va a depender de la eficiencia reproductiva, ya que cualquiera que sea el objetivo de dicho sistema de producción (leche, carne o pie de cría), se requerirá de un evento reproductivo, el parto, por consiguiente si hubiesen problemas reproductivos tales como la endometritis subclínica, bajará la eficiencia y por ende los réditos económicos que éstos nos pudieran brindar, por lo que es un mal que aqueja en las ganaderías de todo el mundo.

El ganado bovino es una especie básica en la ganadería de nuestro País, encontrándose distribuida por todas las Provincias para el aprovechamiento de su carne, leche, cuero y estiércol, por lo que se considera de gran importancia su buen desempeño reproductivo, razón por la cual todos los que estamos vinculados a la explotación de estos animales tenemos la responsabilidad de buscar alternativas para mejorar su rendimiento reproductivo.

Durante los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para el control de la endometritis subclínica, sin embargo su prevalencia es elevada. Existe una asociación entre la endometritis subclínica y la disminución en la tasa de concepción. La endometritis bovina es una enfermedad que afecta hasta en un 90% de las vacas en el periodo posparto temprano en las ganaderías sean estas de carne o leche (FOLDI, 2006); pero debido a los poderosos mecanismos de defensa localizados en el endometrio que son secretados con los loquios que tienen alto contenido de leucocitos fagocitan a los microorganismos patógenos (ALVES, 2004) y ayudan de alguna forma a controlar este mal, pero aun así su incidencia es elevada y contribuyen un alto índice de infertilidad en vacas o vaconas produciendo pérdidas significables en las ganaderías bovinas.

En la práctica profesional se utilizan distintas técnicas con el fin de evaluar el estado de la mucosa uterina y por ende, la presencia de inflamación del endometrio. ARCHBALD, 2002, midieron concentraciones plasmáticas de 13,14-dihidro,15-ceto-PGF2 α para diagnosticar la existencia de endometritis subclínica en el postparto de vacas lecheras y obtuvieron resultados insatisfactorios, por tal motivo la utilización de dicha técnica quedó en desuso.

JUSTIFICACIÓN

Esta investigación es sumamente importante porque es única en su tipo, al menos en nuestro País, existen investigaciones similares realizadas en otras partes del mundo pero que se han realizado en vacas postparto, y no en vacas post inseminación artificial, como está definido en mi tema de investigación; además ésta es una técnica nueva que necesita ser estudiada e investigada con mucha más profundidad, para adquirir destrezas y habilidades en este tema, a más de que según KASIMANICKAM y col., 2008., consideran que el Cytobrush ha demostrado ser la mejor técnica para la obtención de citologías uterinas en vacas para el diagnóstico de endometritis.

Con la ejecución de esta investigación tendremos los primeros datos en nuestro País, en esta etapa del ciclo reproductivo con respecto al diagnóstico de la endometritis subclínica.

En la actualidad la endometritis subclínica en vacas es uno de los principales factores de pérdida de la explotación bovina por el alto grado de infertilidad que causa, es por eso que se realizara esta investigación para tener un método de diagnóstico específico para esta patología.

Esta investigación servirá en el ámbito de la reproducción bovina, para obtener datos confiables y específicos de la endometritis subclínica que afecta a gran parte de los hatos ganaderos y será un punto de partida para que se pueda realizar otras

investigaciones en nuestro país, ya que la mayoría de trabajos se han realizado en vacas y vaconas post parto y esta investigación plantea la posibilidad de diagnosticar endometritis subclínica post inseminación artificial, que no está siendo estudiada en esta etapa del bovino por lo que se considera una investigación muy importante.

Además es un requisito previo la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista.

OBJETIVOS

General

Diagnosticar endometritis subclínica en vaconas mestizas vacías 45 días post inseminación artificial mediante CYTOBRUSH

Específicos

- Valorar el grado de inflamación de endometritis subclínica obtenido mediante la técnica de Cytobrush, para diagnosticar endometritis subclínica 45 días post inseminación artificial.
- Identificar el porcentaje de Polimorfonucleares neutrófilos obtenidos del Cytobrush, para diagnosticar endometritis subclínica 45 días post inseminación artificial.
- Determinar la prevalencia de endometritis subclínica obtenidos del Cytobrush, 45 días post inseminación artificial.
- Realizar un cultivo y antibiograma de las muestras obtenidas mediante la técnica de Cytobrush, para diagnosticar endometritis subclínica 45 días post inseminación artificial.

INTRODUCCIÓN

En esta investigación se plantea el siguiente objetivo general: Diagnosticar endometritis subclínica en vacas mestizas vacías 45 días post inseminación artificial mediante Cytobrush (citología endometrial) y los específicos: Valorar el grado de inflamación de endometritis subclínica obtenido mediante la técnica de Cytobrush; Identificar el porcentaje de Polimorfonucleares neutrófilos obtenidos del Cytobrush; Determinar la prevalencia de endometritis subclínica y Realizar un cultivo y antibiograma de las muestras obtenidas mediante la técnica de Cytobrush.

Los problemas reproductivos en la Amazonia Ecuatoriana, están condicionados por un sin número de factores, que directa e indirectamente conspiran para mejorar los parámetros productivos de la zona. Las condiciones ambientales, el manejo, la falta de energía en la dieta, la sanidad, la humedad, la temperatura, el tipo de geografía irregular y los genotipos utilizados influyen para no lograr una eficiente reproducción.

La técnica de inseminación artificial se realiza en general sin tener en cuenta el estado del endometrio, a excepción de aquellos animales que manifiesten algún signo que permita determinar la existencia de entidades mórbidas manifiestas como la metritis y la endometritis clínica, por tal razón es necesario reducir el margen de error reproductivo a la mínima expresión.

En estudios recientes (GREEN *et al.*, 2011) han observado que la endometritis subclínica (ES) modifica las concentraciones de esteroides ováricos afectando la calidad del ovocito y esto podría explicar, en parte, las tasas de concepción más bajas y mayor intervalo entre el parto y la concepción que se asocian a menudo con la endometritis subclínica. La exposición de la mucosa uterina al plasma seminal y la secreción de las vesículas seminales indican un potencial desarrollo de los procesos inflamatorios en el útero de la especie bovina (ALOÉ y col., 2011).

CAPÍTULO I

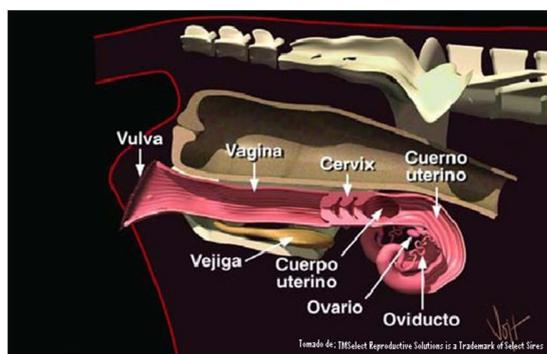
En el presente capítulo se muestra la revisión bibliográfica sobre el aparato reproductor femenino bovino, su ciclo estral, el tejido del útero, inmunología uterina, endometritis, Cytobrush, cultivos y antibiogramas, información muy necesaria para el desarrollo de la investigación.

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO BOVINO

El aparato genital femenino es el órgano de reproducción de las hembras. Está capacitado para la producción de ovocitos y facilita su unión con los espermatozoides, así como el posterior alojamiento del embrión y el feto hasta el nacimiento. Para su estudio el aparato reproductivo de la hembra se ha clasificado en órganos genitales externos e internos (GÁZQUEZ A., 2004).

GRÁFICO 1. REPRESENTACIÓN DEL APARATO REPRODUCTOR DE LA HEMBRA BOVINA



Fuente: Dejarnette y Nebel 2004.

1.1.1. Genitales externos

Constituidos por: el vestíbulo, labios mayores, labios menores, clítoris, glándulas vestibulares.

1.1.1.1. Vestíbulo

El vestíbulo de la vaca se extiende hasta el sitio donde el orificio uretral externo se abre en su superficie ventral. La pared del vestíbulo es similar a la de la zona posterior de la vagina, aunque existe mayor cantidad de tejido linfoide nodular en la zona superficial de la lámina propia-submucosa. En la pared vestibular existe gran cantidad de vasos sanguíneos y linfáticos, además de un laberinto de espacios cavernosos que se comportan como un tejido eréctil. En el tejido conectivo de la pared se pueden observar las denominadas glándulas vestibulares mayores y menores, que son glándulas tubuloalveolares mucosas. (BLANCO, 2004).

1.1.1.2. Vulva

La vulva es la apertura externa del aparato reproductor; ella tiene dos funciones principales: abrirse para permitir la cópula y sirve como parte del canal de parto. Incluidos en la estructura vulvar están los labios y el clítoris. Los labios de la vulva están ubicados a los lados de la apertura vulvar, y tienen aspecto seco y arrugado cuando la vaca no está en celo. En la medida que el animal se acerque al celo, la vulva empezará a hincharse y tomará una apariencia rojiza y húmeda (QUINTELA *et al.*, 2006)

1.1.2. Genitales internos

Constituidos por: vagina, cérvix, útero, oviductos o trompas de Falopio, ovarios.

Los órganos genitales internos como el cérvix y el útero están sostenidos por el ligamento ancho. Este ligamento consta del mesoovario, que sostiene al ovario; el mesosálpinx, que sostiene el oviducto; y el mesometrio, que sostiene al útero. En bovinos, la inserción del ligamento ancho es dorso lateral en la región del íleon, del modo que el útero está dispuesto como los cuernos de un carnero, con la convexidad dorsal y los ovarios situados cerca de la pelvis (HAFEZ, 2005)

1.1.2.1. Vagina

Se extiende desde la apertura uretral hasta el cérvix. Durante la monta natural, el eyaculado es depositado en la porción anterior de la vagina. La vagina también sirve como parte del canal de parto. (SISSON et al, 2005).

1.1.2.2. Cérvix

Es un órgano de paredes gruesas, que establece la conexión entre la vagina y el útero. Es un órgano fibroso formado predominantemente por tejido conectivo con pequeñas cantidades de tejido muscular liso. El cérvix o cuello uterino se caracteriza por una pared gruesa y una luz estrecha. Presenta varias prominencias que tiene la forma de bordes transversales alternados en espiral que se conocen como anillos cervicales. Esta estructura anatómica se encuentra perfectamente cerrada excepto durante el estro, cuando se relaja ligeramente y permite la entrada de espermatozoides al útero. La secreción mucosa del cuello uterino se expulsa por la vulva. (DUCHENS, 2010)

1.1.2.3. Útero

Consta de dos cuernos uterinos y un cuerpo. Tiene un tabique que separa los dos cuernos, y un cuerpo uterino prominente. Ambos lados del útero están unidos a las paredes pélvicas y abdominales por el ligamento ancho. Es el componente fundamental del aparato genital femenino que tiene como función el asentamiento e

implantación del óvulo en caso de ser fecundado, aquí posteriormente se aloja el producto permitiendo el desarrollo del feto hasta el parto, momento en que ayuda con las contracciones a la expulsión del feto. (GROSSMAN, 2006).

1.1.2.4. Oviductos

Puede dividirse en cuatro segmentos funcionales: las fimbrias, en forma de ola, el infundíbulo, abertura abdominal en forma de embudo cerca del ovario; el ampulla, dilatada y más distal, y el istmo, la porción proximal estrecha del oviducto, que conecta a este con la luz uterina. La mucosa del oviducto está constituida por pliegues primarios, secundarios y terciarios. La del ampulla está dispuesta en pliegues elevados y ramificados cuya altura disminuye hacia el istmo y que se convierten en bordes bajos en la unión uterotubárica, donde se unen el oviducto y el cuerno uterino correspondiente. (BLANCO, 2004).

Las contracciones de los oviductos facilitan la mezcla de su contenido, ayudan a desnudar el ovulo, facilitan la fecundación al incrementar el contacto entre espermatozoides y ovulo (HAFEZ, 2005).

1.1.2.5. Ovarios

Los ovarios de la vaca miden normalmente de 3.5 a 4 cm de longitud, 2.5 cm de ancho y tienen alrededor de 1.5 cm de grueso en su porción mayor, el peso es de 15 a 20 g. En bovinos el ovario tiene forma de almendra. (GROSSMAN, 2006).

El ovario se constituye como un cuerpo ovoide en el que es posible distinguir una zona gruesa periférica, o corteza, y una zona interna o médula. La corteza está recubierta por una lámina continua de epitelio denominado epitelio germinal que cuando alcanza el hilio ovárico se continúa con el mesotelio del repliegue peritoneal. Debajo del epitelio germinal hay una capa de tejido conectivo fibroso denominado

túnica albugínea. La medula es la zona central del ovario, compuesta por tejido conectivo laxo con fibras musculares lisas y abundante inervación y vascularización. Los vasos sanguíneos de esta zona son muy tortuosos y de gran tamaño. (GÁZQUEZ A., 2004)

El ovario, a diferencia del testículo, permanece en la cavidad abdominal. Realiza tanto funciones exocrinas (liberación de óvulos) como endocrinas (esteroidegénesis). El ovario no funciona como una glándula de secreción interna, pero contiene el patrimonio genético, consistente en varios miles de folículos primordiales. (SQUIRES, 2003).

1.1.3. Ciclo estral

Todas las hembras pertenecientes a los mamíferos, desde el inicio de la pubertad se caracterizan por presentar ciclos estruales, llamados así debido a que la parte del ciclo que se puede detectar visualmente es el estro o celo. En la vaca el ciclo dura entre 17 y 24 días, sin embargo, 20 y 21 días es lo más común. La actividad sexual tiene lugar en la pubertad o madurez sexual que en la novilla comienza aproximadamente a los 12 meses de edad, y está estrechamente correlacionada con la actividad funcional endocrina de los ovarios. (GÁZQUEZ A., 2004).

El ciclo estrual se caracteriza por tener dos fases:

- FASE FOLICULAR: durante la cual ocurren dos periodos del ciclo; el proestro y el estro.
- FASE LUTEAL: la responsable de la presentación de los otros dos periodos en el ciclo, el metaestro y el diestro.

La sucesión de eventos que ocurren durante el ciclo estrual, así como los eventos subsecuentes que siguen a cada ciclo, dependen del resultado de la intervención en el

manejo de los animales. En otras palabras si la vaca es inseminada o servida por el macho resultara en una gestación. Por otro lado, si no ocurre la gestación o existen factores que impiden la concepción los pasos subsecuentes y los tiempos en que estos ocurren varían considerablemente. (QUINTELA et al, 2006)

1.1.4. Fisiología del ciclo estral

Una vez que se logra la pubertad, los ciclos estrales se presentan a intervalos regulares y sin interrupción, a menos que se inicie una gestación o que las condiciones nutricionales sean muy malas. Por estas razones se clasifica a la hembra bovina como **poliéstrica típica**. El ciclo estral en la hembra bovina tiene una duración de aproximadamente 21 días. El periodo de estro varía de 2 a 50 horas, pero promedia 12 a 18 horas en la mayoría de las condiciones. En vacas lecheras en manejo intensivo, se describe una duración promedio del celo de aproximadamente 7 horas. (HAFEZ, 2002)

La ovulación es espontánea, es decir ocurre independiente de la existencia de una monta, y se presenta aproximadamente 24 a 30 horas después del inicio del celo. Generalmente es un solo ovocito el que ovula; las ovulaciones dobles (y por lo tanto la probabilidad de gestación de mellizos) son poco frecuentes. Los primeros signos de celo generalmente coinciden con el inicio del alza preovulatoria de las hormonas luteinizante (LH) y foliculo estimulante (FSH). La temperatura ambiental alta no parece alterar la duración del ciclo estral, pero puede reducir la duración e intensidad del celo, y reducir el flujo de sangre al tracto reproductivo y alterando las concentraciones de algunas hormonas reproductivas. (DUCHENS, 2010)

El ciclo estral se divide tradicionalmente en 4 fases:

- Estro (día 0)
- Metaestro (días 1 a 3)
- Diestro o fase luteal (días 4 a 8)

- Proestro o fase folicular (día 19 hasta el inicio del siguiente celo)

El **estro** se caracteriza por la receptividad sexual de la hembra, a un toro o a la actividad de monta de otras hembras, además del crecimiento de un folículo y su preparación para la ovulación. El **metaestro** comprende las fases finales de la maduración folicular y la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y el inicio de la secreción de progesterona. Una vez que se observan concentraciones significativas de progesterona ($\geq 1 \text{ ng mL}^{-1}$) en la sangre, es el comienzo de la **fase luteal o diestro**, la que continúa hasta que el cuerpo lúteo comienza a regresar al inicio de la luteolisis. En la medida que las concentraciones de progesterona en sangre comienzan a declinar rápidamente producto de la lisis luteal, se inicia el **proestro o fase folicular**, llevando al crecimiento de una onda folicular y la selección de un folículo ovulatorio. (DUCHENS, 2010)

1.1.5. Modificaciones histológicas durante el ciclo estral

Durante el anestro, el epitelio vaginal está constituido por dos o tres capas de células cúbicas. Durante el proestro, debido a las concentraciones crecientes de estrógenos, el epitelio comienza a dividirse, constituyendo un epitelio estratificado plano con unas 16 capas de células. Conforme desciende la concentración de estrógenos, en el epitelio se incrementa el número de células queratinizadas que mueren y se desprenden, disminuyendo el número de células nucleadas. Durante el estro, el epitelio está constituido por unas 12-20 capas, de las cuales, las más superficiales están queratinizadas y se descaman. Hacia el final del estro y durante el metaestro, el epitelio y la propia-submucosa son infiltrados por gran **cantidad de neutrófilos** y el grosor disminuye hasta unas 3-6 capas. Hacia la mitad del metaestro, el epitelio se queda con tan sólo dos capas y disminuye el infiltrado de neutrófilos. (SALAZAR et al, 2012)

1.1.6. Tejido del útero

El útero es el lugar de implantación del óvulo cuando es fecundado y donde se desarrolla la placenta y el feto. En la mayoría de las especies presenta dos cuernos, un cuerpo y un cuello o cérvix. Su pared consta de tres capas:

- Endometrio (mucosa y submucosa)
- Miometrio (muscular)
- Perimetrio (serosa).

1.1.6.1. Endometrio

Presenta dos zonas que difieren en su estructura y función:

- ✚ ZONA SUPERFICIAL O FUNCIONAL: degenera total o parcialmente durante un ciclo reproductor y puede perderse en alguna especie, regenerándose a partir de la zona basal. Está revestida por un epitelio que en rumiantes puede ser simple cilíndrico y/o pseudoestratificado. La altura de las células epiteliales está relacionada con el estado hormonal de la hembra a lo largo del ciclo estral. Bajo el epitelio, aparece un tejido conectivo altamente vascularizado con macrófagos y mastocitos, un número variable de neutrófilos y linfocitos según la fase del ciclo estral y melanocitos en la oveja. En los rumiantes, en esta zona y especialmente en el estro, hay un aumento del fluido intercelular constituyendo un edema endometrial.
- ✚ ZONA PROFUNDA O BASAL: se presenta durante todo el ciclo y está constituida por un tejido conectivo laxo menos celular.

(SALAZAR et al, 2012)

1.1.6.1.1. Modificaciones histológicas durante el ciclo sexual

Pueden diferenciarse tres fases:

- 1. Fase proliferativa:** coincide con el crecimiento de los folículos ováricos y la secreción de estrógenos y se caracteriza por un aumento de grosor en el endometrio debido a la hipertrofia e hiperplasia de las glándulas y al alargamiento de las arterias helicineas.
- 2. Fase secretora:** coincide con el periodo en el que el cuerpo lúteo es funcional y hay secreción de progesterona y se caracteriza porque el endometrio alcanza su máximo grosor y hay un desarrollo máximo de las glándulas y un alargamiento máximo de las arterias. En esta fase es en la que aparece el edema endometrial. Esta es la situación óptima para recibir al óvulo fecundado. Si eso no ocurre, se pasa a la siguiente fase.
- 3. Fase de involución:** coincide con la desaparición de los estímulos hormonales y se caracteriza porque hay una disminución en el grosor del endometrio por una involución de glándulas y arterias, volviendo a la fase de reposo o preproliferativa. (SALAZAR et al, 2012)

1.1.6.2. Miometrio

Está constituido por dos capas de músculo liso, una circular interna muy gruesa y otra longitudinal externa más fina. Ambas aumentan de grosor durante la gestación. Entre ambas o en profundidad a la interna se desarrolla una zona con gran cantidad de vasos sanguíneos. (HAFEZ, 2005)

1.1.6.3. Perimetrio

Está constituido por tejido conectivo laxo muy vascularizado con fibras musculares lisas que aparece recubierto por un mesotelio. (SALAZAR et al, 2012)

1.1.7. Inmunología uterina

El endometrio de la vaca posee poderosos mecanismos de defensa que lo protegen de agentes invasivos inespecíficos, comenzando por la cubierta de células epiteliales pseudoestratificadas, químicamente por el moco secretado por las glándulas endometriales e inmunológicamente por la acción de células polimorfonucleares y anticuerpos humorales (DHALIWAL, 2001). Por otro lado la respuesta hormonal con la PGF produciendo lisis del cuerpo lúteo (CL) incrementa la respuesta inflamatoria incrementando la función de los neutrófilos (LEWIS, 2004), y los estrógenos favorecen la fagocitosis bacteriana (HUSSAIN, 2009), también favorece la epitelización y vascularización endometrial, induce la formación de moco a nivel cervical y produce contractibilidad uterina; aunque esto a veces se suprime por los niveles de progesterona elevados. La mucosa del útero al igual que otras partes del aparato genital femenino, presenta un mecanismo fisiológico de defensa contra las infecciones uterinas. Este mecanismo de defensa de los órganos de reproducción femeninos incluye factores tales como: cambios de pH, alteraciones de la composición de las secreciones genitales, cambios del nivel de anticuerpos, alteraciones en la actividad fermentativa y sobre todo, cambios en el volumen de las células del sistema retículo-endotelial, cuyo número aumenta notablemente. La interacción coordinada de estos factores se manifiesta claramente aumentada durante períodos de mayor peligro de penetración de microorganismos. (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007)

Los fallos en el mecanismo de defensa uterino pueden ser un factor importante en el desarrollo de infecciones uterinas en el bovino y el fracaso de los agentes terapéuticos en eliminar dichas infecciones. La infiltración de linfocitos, la que puede ser causada por la introducción de bacterias durante la inseminación o la monta o por la presencia de los espermatozoides en el útero, constituye un mecanismo de defensa del útero. El moco cervical posee altas cantidades de leucocitos, los cuales tienen la propiedad de

impedir la introducción de factores perjudiciales a la fecundación tales como bacterias o espermatozoides muertos (HAFEZ, 2002)

El mecanismo encargado de la eliminación de las bacterias del útero es la fagocitosis y muerte por los leucocitos que migran aunque la persistencia de las contracciones uterinas, la eliminación del tejido caruncular y las secreciones uterinas cooperan mediante la expulsión física de las bacterias (ARTHUR, 2002). Se valoró que alrededor de los dos días después de producirse el parto, este sistema de defensa es estimulado por los microorganismos invasores y que además la flora normal actúa como una defensa primaria del hospedador ya que el útero saludable de la vaca es capaz de controlar rápidamente la invasión bacteriana durante el puerperio, mediante la infiltración leucocitaria, la hiperemia y la relajación del cuello uterino (BRITO, 2012)

1.2. ENDOMETRITIS

Es un término general que se usa para designar a las infecciones uterinas del endometrio o de las capas más profundas que pueden o no producir signos septicémicos pero que pueden tener implicaciones en la aptitud reproductora futura. Histológicamente la endometritis se caracteriza por rotura del epitelio superficial, infiltración con células inflamatorias, congestión vascular, edema del estroma y por varios grados de acumulación de linfocitos y células plasmáticas en la capa superficial. (LEBLANC et al, 2002)

MARTÍNEZ, *et al.*, 2006 menciona, que la endometritis subclínica se encuentra entre las causas que pueden llevar a las vacas a fracasar en la gestación y repetir celos, siendo difícil el diagnóstico ya que los signos clínicos suelen pasar desapercibidos. No es fácil detectarla por el examen rectal y el estudio bacteriológico del mucus uterino no refleja el estado del endometrio; sin embargo, los análisis de las biopsias

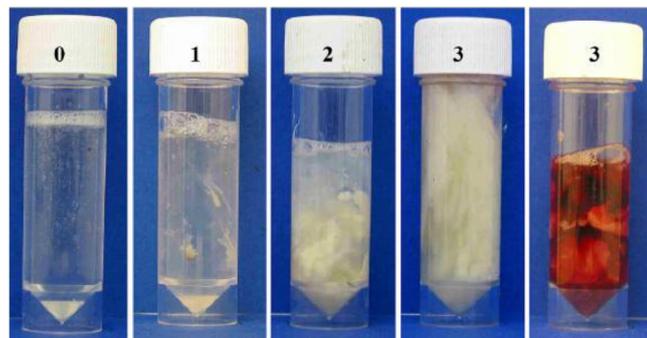
endometriales y la microbiología cuidadosa del útero pueden colaborar en el diagnóstico

1.2.1. Clasificación

- a) **Clínica.-** Se caracteriza por presentar descarga mucopurulenta desde el útero hacia la vagina e incluso al exterior después de los 21 a 26 días postparto.
- b) **Subclínica.-** Se caracteriza por que no tienen descarga uterina, sin embargo, la enfermedad provoca daños severos para el rendimiento reproductivo de la vaca. (SHELDON I.M., 2004)

La endometritis clínica es aquella en la que pueden ser detectados signos visibles de enfermedad, mientras que la endometritis subclínica ha sido definida como la presencia de neutrófilos en el lumen uterino sin descargas (SHELDON I.M., 2004)

GRÁFICO 2. EJEMPLOS DE DESCARGA UTERINA.



Sin endometritis = 0-2 y endometritis = 3

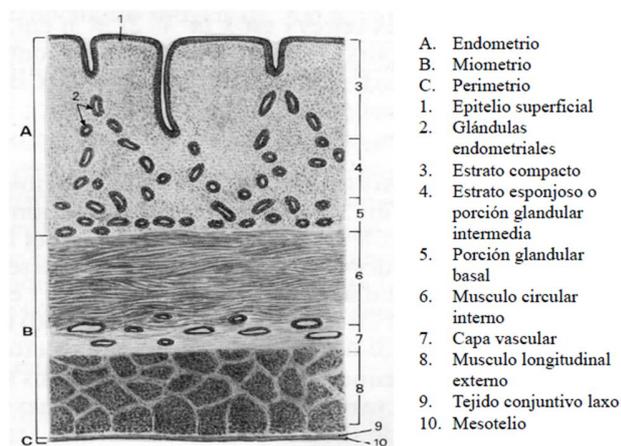
Fuente: Williams *et al.*, 2007

1.2.2. Endometritis subclínica

Es la inflamación superficial del endometrio, la cual se extiende solo hasta el estrato esponjoso. Histológicamente, la endometritis está caracterizada por algunas zonas de

perdida de la superficie epitelial, infiltración subepitelial de células inflamatorias, congestión vascular y edema del estroma y varios grados de acumulación de linfocitos y células plasmáticas en las capas superficiales de la lámina propia. Algunos animales con endometritis pueden presentar un exudado purulento. Sin embargo, en la endometritis subclínica no se observa exudado purulento en la vulva, lo que hace muy difícil su diagnóstico a nivel de campo. (REBHUN, 2009).

GRÁFICO 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN CORTE HISTOLÓGICO TRANSVERSAL DEL ÚTERO BOVINO



Fuente: Constantin and Meissonnier

1.2.2.1. Etiología.

La mayor parte de las infecciones uterinas conocidas afectan a las vacas lecheras y de las diversas bacterias que interfieren en esta enfermedad está el *Actinomyces pyogenes* que es la más frecuente en este animal. En el periodo posparto de las vacas se libera PGF_{2a} ya sea en el puerperio normal o en presencia de infecciones uterinas, pero este caso persisten concentraciones más elevadas por más tiempo. Al parecer estas infecciones bacterianas y sus toxinas hacen que se secreten concentraciones anormalmente más elevadas de prostaglandina, lo que demora el inicio del ciclo hasta que la infección cede y aquellas infecciones son bajas. (HAFEZ, 2002)

Existen varios géneros de bacterias causantes de esta infección y pueden estar solas o en combinación, entre algunas están la *Archaeobacterium pyogenes* y *Escherichia coli* que usualmente actúan ambas. En otras ocasiones el *A. pyogenes* también se encuentra asociado a gérmenes anaerobios como *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides spp.* (SEALS, 2002).

1.2.2.2. Patogenia.

FOLDI, 2006, menciona que después del parto el útero de las vacas sufre una contaminación bacteriana en un 90% de los casos. Existe diferencia entre contaminación e infección uterina; la contaminación en vacas posparto por determinadas bacterias no implica el desarrollo de la enfermedad, en cambio la infección uterina por microorganismos patógenos que se adhieren a la mucosa endometrial colonizándola y penetrando en el epitelio. El proceso se caracteriza porque superficialmente existen cambios y degeneración del endometrio, congestión vascular y edema, además hay migración de neutrófilos y otras células presentes en la inflamación (linfocitos y células del plasma).

1.2.2.3. Factores predisponentes para la aparición de la endometritis:

- **Manejo y medio ambiente:** incluye los factores relacionados con el estrés, la alta producción y las enfermedades metabólicas y carenciales.
- **Condiciones alrededor del parto:** tiene en consideración la higiene, distocias, traumatismos y la poca relajación del canal del parto.
- **Condiciones uterinas:** considera la disminución de la inmunidad local, el tono uterino, la capacidad fagocitaria de los leucocitos y la aparición del primer celo postparto. (FOLDI, 2006)

1.2.2.4. Vías de transmisión:

1.2.2.4.1. Vía ascendente

Esta vía de infección es más común en las fases tempranas de la gestación. Los microorganismos pueden entrar por la vagina, desde donde ascienden hacia el útero o pueden ser depositados directamente en el útero durante la cópula o la inseminación artificial. En hallazgos bacteriológicos y patológicos en novillas clínicamente diagnosticadas como infértiles, atribuyó el origen de la salpingitis a la extensión directa de la endometritis a través del cérvix. En la inseminación artificial el semen es depositado en el útero, por lo tanto, no es expuesto a los efectos bactericidas de las secreciones del cuello uterino y de la vagina durante el estro. (CATENA M., 2006)

1.2.2.4.2. Vía hematógena

Adquiere mayor importancia hacia el final de la gestación. El microorganismo infectante puede entrar al organismo materno a través del aparato digestivo (*Brucella abortus*, *Salmonella*, *Leptospira*, *Listeria*), o de la mucosa nasal o conjuntival (rinotraqueitis infecciosa bovina, leptospirosis, parainfluenza, diarrea viral bovina); en todo caso siempre existe una bacteria o viremia materna antes de que se produzca la invasión del útero, desde el cual el microorganismo infectante puede invadir la placenta y luego pasar al feto. Las cavidades cerradas como en las piómetras proporcionan un medio adecuado para el crecimiento bacteriano; cuando esto sucede el origen de los microorganismos infectantes es probablemente hematógeno. (CATENA M., 2006)

1.2.2.4.3. Vía descendente

Es la ruta más rara y consiste en el descenso de una infección desde los oviductos hacia el útero, puede ocurrir en casos de peritonitis. (CATENA M., 2006)

1.2.2.5. Signos clínicos.

La endometritis generalmente se asocia a la retención de placenta, la presencia de distocia y al nacimiento de fetos muertos o al parto gemelar, esta enfermedad puerperal se caracteriza por descarga uterina de líquidos de olor fétido y color rojo oscuro de consistencia acuosa; pero en casos más graves puede haber disminución considerable de la producción láctea, letargo, anorexia, elevación de la cola con pujos, fiebre $>40^{\circ}\text{C}$, toxemia y deshidratación leve o marcada. (DRILLICH M, 2006)

1.2.2.6. Diagnóstico.

Las endometritis pueden ser diagnosticadas cuando no existen flujos uterinos a través de la vulva, ni manifestación sistémica; mediante la palpación rectal, la vaginoscopia o la introducción de la mano enguantada en la vagina analizando la consistencia, el color y el olor de la secreción; como técnicas rápidas y de fácil uso. La endometritis subclínica normalmente se diagnostica con un examen citológico del útero (cytobrush), la cual estudia la población celular en el útero. La endometritis subclínica se caracteriza por la presencia de $<5\%$ de células polimorfonucleares (PMN, particularmente neutrófilos). (PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA ANTES Y CUATRO HORAS DESPUÉS DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL EN VAQUILLONAS, 2012)

1.3. CYTOBRUSH

La citología endometrial es una práctica que recientemente se ha comenzado a utilizar para la evaluación de la salud uterina en bovinos. Se caracteriza por ser rápido, específico, sensible y económico, lo que la hace una herramienta valiosa para la investigación sobre el rol y la importancia de la endometritis. (KASIMANICKAM, y otros, 2007)

1.3.1. Definición

La técnica de cytobrush (CB) se basa en la obtención de células a partir del endometrio, mediante un cepillado de la superficie interna del útero, técnica muy confiable y no genera alteración celular. El CB ha demostrado ser la mejor técnica para la obtención de citologías uterinas en vacas para el diagnóstico de endometritis subclínica (ES) (KASIMANICKAM, 2005).

La endometritis subclínica puede ser diagnosticada por medio de citología endometrial, en la cual se mide la proporción de neutrófilos presentes en una muestra recogida por el método de lavado del lumen uterino, o el uso de un Cytobrush. (VALLEJO D., 2014)

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. (CAMPERO, 2008)

La técnica de CB permite lograr una muestra rápida y con morfología celular preservada para el diagnóstico de inflamación subclínica del endometrio.

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. (DOHOO, 2009)

El examen citológico endometrial se utilizó principalmente para el diagnóstico en mujeres, yeguas y luego en vacas; estos métodos comprenden:

- a. La biopsia y/o el cultivo bacteriológico uterinos han sido considerados los exámenes diagnósticos de referencia para endometritis. Ninguna de estas técnicas son ampliamente utilizadas; sin embargo, la biopsia uterina ha sido asociada con una disminución de la tasa de concepción al primer servicio e infecciones de cierta importancia más allá de las tres semanas postparto son invariablemente asociadas con una única bacteria *Arcanobacterium pyogenes*.
- b. Lavado uterino que consiste en hacer una infusión de suero fisiológico dentro del útero con un catéter por fijación manual recto-cervical y se masajea para realizar un lavado, luego se aspira el líquido que será examinado en el laboratorio.
- c. Cepillado endometrial (cytobrush), es un método similar al anterior, sino que aquí se reemplaza el catéter por un cepillo que se introduce al útero cubierto por un tubo protector y cuando está dentro se lo libera y se realiza un cepillado del endometrio, se extrae el cepillo con las partículas adheridas para luego ser examinadas en el laboratorio.

Estos dos últimos métodos determinan la cantidad de células de defensa como neutrófilos que están presentes en todo proceso inflamatorio.

(KASIMANICKAM, 2002).

CUADRO 1. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE 5 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS.

Técnica	Facilidad de uso	Tiempo al resultado	Sensibilidad relativa	Especificidad relativa
Palpación rectal	++++	++++	+	+++
Vaginoscopía	+++	++++	++	+++
Ultrasonografía (fluido intrauterino)	+++	++++	++	++++
Citología (Lavado)	+	+	+++	++++
Citología (Cytobrush)	++	++	+++	++++

Fuente: (COLIN, 2008)

GRÁFICO 4. PISTOLA CYTOBRUSH



Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015

1.4. CULTIVO

En microbiología, son ambientes artificiales que contienen los elementos nutritivos y las condiciones físico - químicas que permiten el desarrollo, crecimiento, conservación y estudio de los microorganismos.

Un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como bacterias, hongos y parásitos, en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado, para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades en medicina humana y veterinaria. (LEDESMA, 2012).

Un microorganismo se puede sembrar en un medio líquido o en la superficie de un medio sólido de agar. Los medios de cultivo contienen distintos nutrientes que van, desde azúcares simples hasta sustancias complejas como la sangre o el extracto de caldo de carne. Para aislar o purificar una especie bacteriana a partir de una muestra formada por muchos tipos de bacterias, se siembra en un medio de cultivo sólido donde las células que se multiplican no cambian de localización; tras muchos ciclos reproductivos, cada bacteria individual genera por escisión binaria una colonia macroscópica compuesta por decenas de millones de células similares a la original. Si esta colonia individual se siembra a su vez en un nuevo medio crecerá como cultivo puro de un solo tipo de bacteria. (RESTREPO, 2015)

GRÁFICO 5. PLACA DE PETRI CON AGAR MCCONKEY SÓLIDO Y UN INÓCULO EN ESTRÍA DE *PROTEUS VULGARIS*.



Fuente: Restrepo Ángela, 2015

1.5. ANTIBIOGRAMA

El antibiograma se lo realiza en un laboratorio y es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos, es considerado como antimicrobiano cualquier sustancia con capacidad de matar o al menos inhibir el crecimiento de los microorganismos y que sea susceptible de utilización como tratamiento en los pacientes. Pueden ser naturales, sintéticos o semisintéticos. La historia moderna de los antibióticos comienza con el descubrimiento de sustancias presentes en unos microorganismos capaces de matar a otros. La utilización de antibióticos supuso un avance enorme en la esperanza de vida de las personas que padecían procesos infecciosos, pero desgraciadamente también supuso un aumento en los niveles de resistencia antibiótica. (LEDESMA, 2012).

Siempre que una toma bacteriológica de finalidad diagnóstica haya permitido el aislamiento de una bacteria considerada responsable de la infección. Establecer esta responsabilidad exige una colaboración entre el bacteriólogo y el clínico. En efecto, en ciertas circunstancias, el microbiólogo no podrá determinar con certeza que el aislamiento de una bacteria exige un antibiograma, sin los datos clínicos que le aporta el médico. Por ejemplo, una bacteria no patógena puede ser responsable de la infección de un enfermo inmunodeprimido o en un lugar determinado del organismo. La presencia de signos clínicos puede ser también determinante para la realización de un antibiograma (por ejemplo: la infección urinaria con un número reducido de gérmenes). (VALL, 2014)

Para un determinado antibiótico, una cepa bacteriana es:

- Sensible, si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.

- Resistente, si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.
- Intermedia, cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología). (DANI, 2010)

GRÁFICO 6. ANTIBIOGRAMA DISCO - PLACA



Fuente: MARTINEZ, 2010.

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente capítulo se presenta una breve descripción del lugar donde se ejecutó la investigación, los animales distribuidos en cada bloque y los pasos que se siguieron para realizar el experimento. Además se detallan los materiales, métodos y metodología utilizada; como también el análisis estadístico aplicado.

2.1. Ubicación de la investigación

PROVINCIA : Pastaza y Napo
CANTÓN : Santa Clara y Carlos Julio Arosemena Tola
SECTOR : Km. 44 vía Puyo – Tena, junto a la desembocadura del Río Piatúa y Anzu
LUGAR DEL ENSAYO: Centro de Investigación, Postgrado y Conservación Amazónica (CIPCA), perteneciente a la Universidad Estatal Amazónica
PRECIPITACIÓN PLUVIAL : Hasta 4000 mm por año
HUMEDAD RELATIVA : 80 %
TEMPERATURA PROMEDIO : 19 a 22 °C
ALTITUD : entre 580 y 990 m.s.n.m.
LÍMITES : Al norte con varios poseionarios de terrenos, al Sur con el Río Piatúa, al Este el río Anzu y al Oeste el río Ayayaku
HORAS LUZ : 12:00 (en promedio)
VIENTO : 3 – 9 km/h
LATITUD : -1.3
LONGITUD : -77.8833333
Fuente: <http://cipca.uea.edu.ec/index.php/ubicacion>, 2014.

GRÁFICO 7. UBICACIÓN DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN, POSTGRADO
Y CONSERVACIÓN AMAZÓNICA, CIPCA



Fuente: <http://cipca.uea.edu.ec/index.php/ubicacion>, 2014

2.2. Recursos

2.2.1. Recursos humanos

- Tesista
- Transporte
- Alimentación
- Colaboradores en la investigación

2.2.2. Materiales de oficina

- Papelería y materiales
- Computadora
- Memoria USB
- Bolígrafos

- Libreta de apuntes
- Perforadora
- Grapadora
- Anillados
- Empastados
- Internet

2.2.3. Insumos

- Overol
- Botas
- Sogas
- Nariguera
- Jeringas 5 ml
- Aguja 18 x 1 ½
- Guantes ginecológicos
- Guantes de manejo
- Gel ginecológico
- Gel desinfectante
- Chemis
- Pistola para poner implantes
- Kit crestar
- Fertagil
- Cipionato de estradiol
- PG2α
- Folligon
- Pistola inseminación artificial
- Catéter inseminación artificial

- Brochas (para Cytobrush)
- Tinción 15
- Porta objetos
- Pistola para Cytobrush
- Tubos vacutainer (tapa roja)

2.2.4. Equipos

- Implantador Crestar
- Termo y equipo de inseminación artificial
- Computadora
- Cámara de fotos
- Ecógrafo (Ibex Pro, transductor lineal de 5.0 MHz)

2.3. Tipo de investigación

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizó el tipo descriptivo y explicativo.

2.3.1. Investigación descriptiva

El objetivo de la investigación descriptiva consiste en llegar a conocer las situaciones, costumbres y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades, objetos, y procesos, en este caso sobre el diagnóstico de endometritis subclínica, 45 días post inseminación artificial por el método de Cytobrush. Su meta no se limita a la recolección de datos, sino a la predicción e identificación de las relaciones que existen entre dos o más variables. Los investigadores no son meros tabuladores, sino que recogen los datos sobre la base de una hipótesis o teoría,

exponen y resumen la información de manera cuidadosa y luego analizan minuciosamente los resultados, a fin de extraer generalizaciones significativas que contribuyan al conocimiento. (LÓPEZ, 2003).

Se anexó la información sobre el grado de inflamación, la presencia y porcentaje de Polimorfonucleares neutrófilos, su prevalencia y los diferentes microorganismos aislados a partir del cultivo, y del antibiograma para su tratamiento, describiendo los resultados investigados durante el desarrollo de la presente investigación, el mismo que por sus condiciones y especificidad se efectuó en el lugar de los hechos.

2.3.2. Investigación explicativa

La investigación explicativa, está dirigida a contestar por qué sucede determinado fenómeno, cuál es la causa o factor de riesgo asociado a ese fenómeno, o cuál es el efecto de la causa, es decir, buscar explicaciones a los hechos. (ROBAYO, 2004)

2.4. Metodología

No experimental, debido a que únicamente se observó el fenómeno como tal, sin ser manipulados o provocados intencionalmente por el investigador.

2.4.1. Métodos

Para la presente investigación se utilizó el método inductivo y deductivo.

2.4.1.1. Inductivo

Se utilizó el método inductivo o inductivismo porque se obtuvo conclusiones generales a partir de las premisas particulares. Se trata del método científico más

usual, que se caracteriza por cuatro etapas básicas: la observación y el registro de todos los hechos; el análisis y la clasificación de los hechos; la derivación inductiva de una generalización a partir de los hechos; y la contrastación. Esto supone que, tras una primera etapa de observación, análisis y clasificación de los hechos, se deriva una hipótesis que soluciona el problema planteado. (SOLIS, 2007)

2.4.1.2. Deductivo

El método deductivo es un método científico que considera que la conclusión está implícita en las premisas; ósea, que la conclusión que deriva de acuerdo a los resultados del grado de inflamación, el número y porcentaje de PMN n, la prevalencia y de los cultivos y antibiogramas que se realizaron, están en dependencia de éstos. Por lo tanto, supone que las conclusiones siguen necesariamente a las premisas: si el razonamiento deductivo es válido y las premisas son verdaderas, la conclusión sólo puede ser verdadera. (ROBAYO, 2004).

2.4.2. Técnicas

Observación y una técnica nueva en Ecuador como es el Cytobrush.

2.5. Análisis estadístico

El diagnóstico de endometritis subclínica en vaconas mestizas vacías 45 días post inseminación artificial se obtuvo mediante la prueba de Chi Cuadrado, que es una prueba estadística no paramétrica.

2.5.1. Unidad de estudio

Inicialmente se trabajó con 38 animales, que fueron sometidas a una sincronización de celo (CRESTAR), inseminación y después de 45 días se realizó el diagnóstico de preñez mediante palpación y ecografía, de las cuales las que se chequearon vacías, se sometieron al Cytobrush, y cada una de éstas representa una unidad experimental.

2.6. Manejo del ensayo

Las 38 vaconas que fueron sometidas a la investigación, previamente estaban chequeadas y en óptimas condiciones para la reproducción.

Luego se sometieron a un protocolo de IATF (CRESTAR), a partir de las 7 am:

Día 0	7mo día	9no día
.....		
3mg norgestomet (Implante auricular subcutáneo)	Retirar implante 150um PG2 α +	IATF GnRH
5mg valerato estradiol (IM)	1mg Cipionato Estradiol 400 UI eCG	

Después de 45 días post inseminación artificial se realizó el diagnóstico de preñez por palpación y ecografía (Ibex Pro, transductor lineal de 5.0 MHz) y las vaconas que se diagnosticaron como no gestantes, se procedió a realizar la técnica del cytobrush.

2.6.1. Toma de muestras de cepillado endocervical o Cytobrush

Se realizó con una palpación transrectal de los órganos genitales internos (ovarios, cuernos, cuerpo y cuello del útero) de cada una de las vaconas, utilizando el brazo

izquierdo enguantado y lubricado con gel ginecológico. Al mismo tiempo, dirigido mediante el brazo derecho, se introdujo en el útero por vía vaginal el instrumental necesario para la toma de muestra. El mismo está conformado por un cepillo colector endocervical (*Medibrush XL, Medical Engineering Co, SA*) cortado en su mango aproximadamente a 5 cm de largo y sujetado al mandril de una pistola de inseminación artificial de acero inoxidable, con una rosca especialmente diseñada para este fin. Para proteger la pistola de la contaminación vaginal, estuvo cubierta con una vaina descartable, para introducirla, pasando a través del cérvix, en la base del cuerno de mayor tamaño, en el caso de notar diferencias entre ambos, o en uno de los cuernos al azar. En este sitio, presionando el mandril, se expulsó el cepillo de la vaina y se lo giró una vuelta completa (360°) en el mismo sentido de las agujas del reloj rozando las cerdas suavemente la mucosa uterina y colectando así la muestra necesaria. Seguidamente, se retrajo el cepillo dentro de la vaina y se retiró del útero y vagina la pistola de inseminación artificial. (MAURINO A, 2012)

2.6.2. Frotis Cytobrush

Una vez fuera del animal, se descartó la vaina, y se expone nuevamente el cepillo para hacerla rodar suavemente sobre un portaobjetos limpio, y debidamente rotulado con el número de arete correspondiente al animal y a la fecha de toma de la muestras. Inmediatamente los frotis fueron resguardados del polvo, para trasladarlos y almacenados en cajas transportadoras, hasta el laboratorio donde se colorearon utilizando una tinción panóptica comercial (Tinción 15, Biopur). (MAURINO A, 2012)

2.6.3. Conteo de células endometriales

Las preparaciones citológicas así logradas se observaron para su análisis con un Microscopio Biológico Digital Motic a un aumento de 40X y 100X, contando un mínimo de 200 células totales (células epiteliales y células inflamatorias), a partir de

las cuales se determinó la proporción de células inflamatorias (polimorfonucleares neutrófilos). (MAURINO A, 2012)

Luego de obtener el % PMN N, se procedió a clasificar a las vaconas como positivas a endometritis subclínicas (ES) siguiendo el criterio de los trabajos publicados por Rinaudo *et al.*, 2012., que consideran como positivos a endometritis subclínica a todos los animales cuyos frotis posean un % PMN N ≤ 5 % de polimorfonucleares neutrófilos.

2.6.4. Cultivo y antibiograma

Una vez que se realizó el frotis obtenido por Cytobrush (citología endometrial), se procedió a sacar con mucho cuidado, evitando contaminar la brocha adaptada a la pistola del cytobrush, poniéndolo dentro de un tubo vacutainer tapa roja (sin EDTA), para el transporte al Centro de Diagnóstico Clínico Veterinario “ANIMALAB CIA. LTDA” para el respectivo análisis.

2.6.5. Tratamiento

El tratamiento fue diferenciado y específico en cada animal de acuerdo al antibiograma reportado, ya que no todos los animales fueron sensibles al mismo antibiótico, se administró antibiótico intramuscular + flunixin meglumine intramuscular (antinflamatorio), por tres días consecutivos. No se realizó infusiones uterinas, posterior a esto se realizó una nueva IATF a los animales.

CAPÍTULO III

En el presente capítulo se detallan los resultados obtenidos en la fase experimentación.

3. ANÁLISIS Y RESULTADOS

3.1. Resultados obtenidos de la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)

Los protocolos de IATF son ampliamente utilizados en el mundo tanto por productores de leche y de carne con resultados aceptables, como los obtenidos en la Amazonía Ecuatoriana con porcentajes de preñez del 54% (LÓPEZ, *et al.*, 2014), pero existe la necesidad de ajustar otros factores que podrían modificar el resultado, como son la técnica de inseminación y el protocolo de descongelado, permitiendo de esta manera contribuir con la homogenización de las respuestas de dicho método (SALGADO *et al.*, 2007), además del resto de los factores como la alimentación, el manejo, el clima, la sanidad, etc., para tener buenos resultados reproductivos.

De las 38 vaconas que inicialmente se sometieron al IATF, después de los 45 días que se procedió a diagnosticar preñez mediante palpación y ecografía se obtuvieron 14 vaconas reportadas como no gestantes, las mismas que se sometieron a un tratamiento diferenciado de acuerdo al antibiograma reportado, (antibiótico (IM) + flunixin meglumine (IM) por 3 días consecutivos), inmediatamente se hizo una nueva IATF, y luego de 45 días que se realizó el diagnóstico de preñez se obtuvieron 7 vaconas reportadas como no gestantes.

CUADRO 2. CONTEO DE CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES NEUTRÓFILOS (PMN n) Y CÉLULAS EPITELIALES (CE), EN LAS DOS TOMAS DE MUESTRAS POR CYTOBRUSH (CB)

N°	ARETE	PRIMER CYTOBRUSH			SEGUNDO CYTOBRUSH			OBSERVACIONES
		CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES neutrófilos	CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES	Relación Polimorfo nucleares/epiteliales. %	CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES neutrófilos	CÉLULAS EPITELIALES ENDOMETRIALES	Relación Polimorfo nucleares/epiteliales. %	
1	6378	12	188	6%				
2	6740	8	192	4%	3	197	2%	Doble Cytobrush
3	5846	38	162	23%	11	189	6%	Doble Cytobrush
4	6753	10	190	5%	6	194	3%	Doble Cytobrush
5	6724	5	195	3%				
6	6743	14	186	8%	2	198	1%	Doble Cytobrush
7	6514	17	183	9%				
8	6263	21	179	12%	8	192	4%	Doble Cytobrush
9	6412	19	181	10%	10	190	5%	Doble Cytobrush
10	6275	15	185	8%				
11	6376	23	177	13%	7	193	4%	Doble Cytobrush
12	6385	32	168	19%				
13	6270	6	194	3%				
14	6739	6	194	3%				

Fuente: Directa

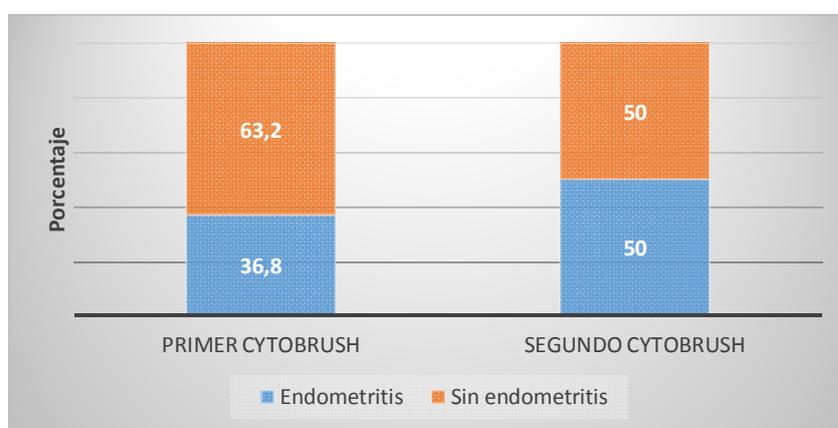
Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015

3.2. Resultados del conteo de células polimorfonucleares neutrófilos (PMN n) y células epiteliales (CE), en las dos tomas de muestras por Cytobrush (CB)

En lo que respecta a la primera toma de muestras por Cytobrush vemos que tenemos un total de 14 animales reportados con endometritis, de los cuales 10 animales tienen endometritis clínica y 4 animales tienen endometritis subclínica; mientras que en la segunda toma de muestras por Cytobrush tenemos un total de 7 animales reportados con endometritis, de los cuales 2 animales tienen endometritis clínica y 5 animales tienen endometritis subclínica (Cuadro 2); aquellos valores que RINAUDO *et al.*, 2012, por definición considera que cuando la muestra citológica tiene < 5 % de

Polimorfonucleares neutrófilos se consideran como positivos a endometritis subclínica y las muestras que tienen $\geq 5\%$ de Polimorfonucleares neutrófilos se consideran como positivos a endometritis clínica.

GRÁFICO 8. PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS EN LAS DOS TOMAS DE MUESTRAS POR CYTOBRUSH (CB)



Fuente: Directa

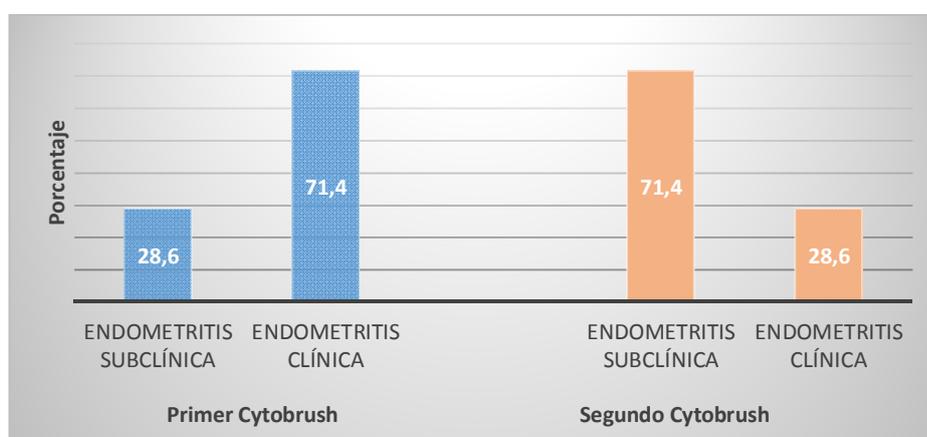
Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

3.3. Resultados de la prevalencia de endometritis en las dos tomas de muestras por Cytobrush (CB)

En lo que respecta a la primera toma de muestras por Cytobrush la prevalencia de endometritis es del 36,8%, de las cuales 71,4% corresponde a endometritis clínica y 28,6% corresponde a endometritis subclínica; mientras que en la segunda toma de muestras por Cytobrush la prevalencia de endometritis es del 50%, de las cuales 28,6% tienen endometritis clínica y 71,4% tienen endometritis subclínica (Gráfico 8), mientras que en un estudio en dos grupos de vaquillonas que realizó MAURINO, *et al.*, 2012, observa primero que dentro de cada grupo hubo animales sanos y con endometritis subclínica, donde en un grupo de vaquillonas el porcentaje de

endometritis subclínica representó el 44,4 % y en el otro grupo de vaquillonas el porcentaje de endometritis subclínica representó el 14,3 %, tomando en cuenta que en éste último no se realizó tratamiento.

GRÁFICO 9. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA vs ENDOMETRITIS CLÍNICA



Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

CUADRO 3. RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANIMALES OBSERVADOS PARA LA PRUEBA DEL CHI CUADRADO AL 5%

OBSERVADOS	Total de animales					TOTAL
	2,50	7,50	12,50	17,50	22,50	
%PMN n/CE	2,50	7,50	12,50	17,50	22,50	TOTAL
TOTAL ANIMALES	4	5	3	1	1	14
Infértiles a la 2da IA	1	2	3	0	1	7
% Infértiles a la 2da IA	25%	40%	100%	0%	100%	2,65
Fértiles a la 2da IA	3	3	0	1	0	7
% Fértiles a la 2da IA	75%	60%	0%	100%	0%	2,35

Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

**CUADRO 4. RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANIMALES
ESPERADOS PARA LA PRUEBA DEL CHI CUADRADO AL 5%**

ESPERADOS	Total de animales					
%PMN n/CE	2,50	7,50	12,50	17,50	22,50	TOTAL
Condicion $y = 0.04 x^*$	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	2,5
TOTAL ANIMALES	4	5	3	1	1	14
Infértiles a la 2da IA	0,4	1,5	1,5	0,7	0,9	5
% Infértiles a la 2da IA	10%	30%	50%	70%	90%	2,5
Fértiles a la 2da IA	3,6	3,5	1,5	0,3	0,1	9
% Fértiles a la 2da IA	90%	70%	50%	30%	10%	2,5

En dónde:

% PMN n: porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos

CE: células epiteliales

IA: inseminación artificial

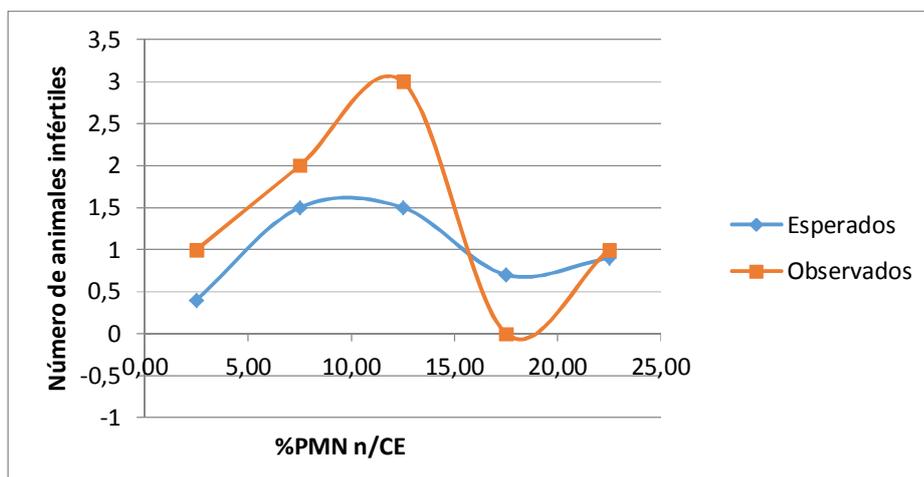
Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

**3.4. Interpretación de los resultados obtenidos de los animales
observados y esperados para la prueba del chi cuadrado al 5%**

En cuanto a los animales observados y esperados del total de los animales reportados con endometritis, tenemos que, la tendencia observada demuestra no mantener diferencias estadísticas con una tendencia lineal esperada equivalente a $y = 0.04 x$ (proporción de animales infértiles de acuerdo a %PMN n/CE), tal como lo describe el Cuadro 3 y Cuadro 4.

GRÁFICO 10. ANIMALES OBSERVADOS Y ESPERADOS PARA LA PRUEBA DEL CHI CUADRADO AL 5%



Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

CUADRO 5. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DEL CHI CUADRADO AL 5%

CHI CUADRADO						χ^2 calculado	χ^2 tab (9;0.05)
%PMN n/CE	2,50	7,50	12,50	17,50	22,50		
TOTAL ANIMALES	4	5	3	1	1		
Número Infértiles a la 2da IA	0,90	0,17	1,50	0,70	0,01	3,28	9,48
% Infértiles a la 2da IA	0,23	0,03	0,50	0,70	0,01	1,47	9,48
Número Fértiles a la 2da IA	0,10	0,07	1,50	1,63	0,10	3,40	9,48
% Fértiles a la 2da IA	0,03	0,01	0,50	1,63	0,10	2,27	9,48

En dónde:

% PMN n: porcentaje de Polimorfonucleares neutrófilos

CE: células epiteliales

IA: inseminación artificial

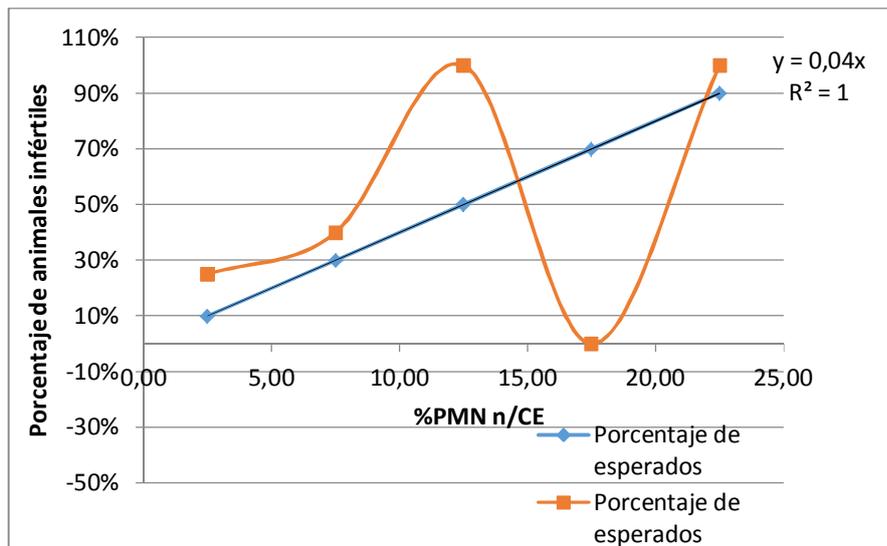
Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

3.5. Interpretación de los resultados obtenidos en la prueba del chi cuadrado al 5%

Al no superar el valor del χ^2 calculado al valor tabulado, la tendencia observada demuestra no mantener diferencias estadísticas con una tendencia lineal esperada equivalente a $y = 0.04x$ (proporción de animales infértiles de acuerdo a %PMN n/CE), lo cual indicaría que la infertilidad en vaconas luego de la segunda inseminación varía en función del porcentaje de células polimorfonucleares neutrófilos sobre el total de células. (Cuadro 5). Dentro de esta tendencia se incluyen aquellos valores que RINAUDO *et al.*, 2012, por definición considera que cuando la muestra citológica tiene $< 5\%$ de Polimorfonucleares neutrófilos se consideran como positivos a endometritis subclínica y las muestras que tienen $\geq 5\%$ de Polimorfonucleares neutrófilos se consideran como positivos a endometritis clínica.

GRÁFICO 11. RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRUEBA DEL CHI CUADRADO AL 5%



Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

**CUADRO 6. CULTIVO DE LA PRIMERA TOMA DE MUESTRAS
POR CYTOBRUSH (CB)**

Nº	MICROORGANISMO AISLADO	NÚMERO DE ANIMALES INFECTADOS
1	Staphylococcus aureus	7
2	Enterococcus faealis	1
3	Streptococcus gama hemolíticos	7
4	Cándida Álbicans	5
5	E. Coli	1
6	Bacillus spp	4
7	Coliformes	2
8	Streptococcus agalactiae (beta hemolíticos)	3
9	Staphylococcus epidermidis	0
10	Acynetobacter spp	0

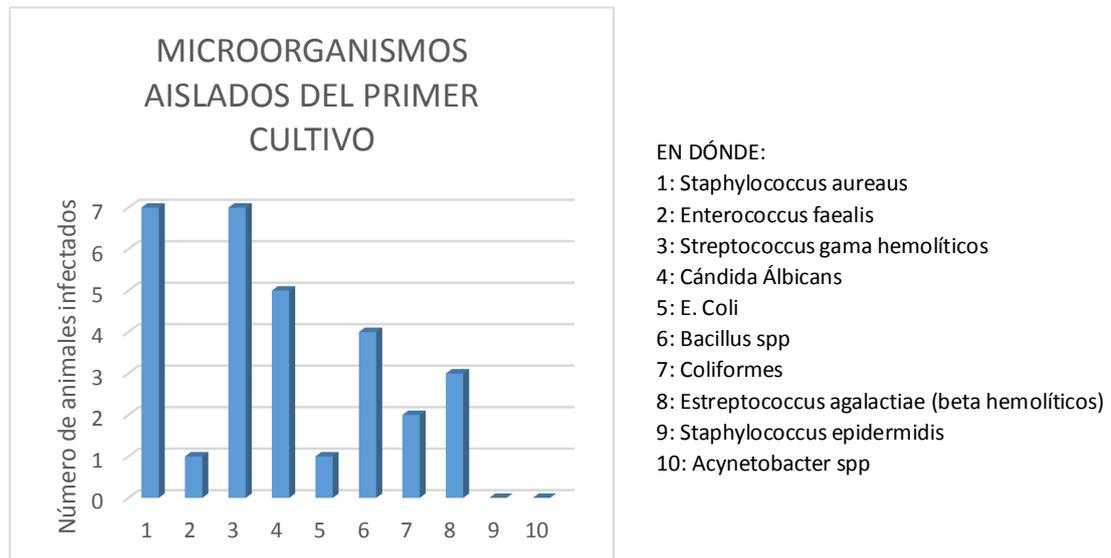
Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

3.6. Interpretación del cultivo de la primera toma de muestras por Cytobrush (CB)

En lo que respecta al primer cultivo, nos muestra que se aislaron 8 microorganismos a partir de la muestra recolectada de los animales reportados como no gestantes, por el método de Cytobrush, siendo el Staphylococcus aureus y el Streptococcus gama hemolíticos los microorganismos predominantes, mientras que el Enterococcus faealis y E. Coli fueron los microorganismos menos encontrados, como nos muestra en el Cuadro 6. En Cuba, FERNÁNDEZ Y DIMOSO 2002, estudiaron la microbiota bacteriana de secreciones cérvico-uterinas de vacas clínicamente sanas. La Escherichia coli fue el germen de mayor incidencia en las muestras del cérvix y útero (28,1 y 23,1% respectivamente) y con menor frecuencia se aislaron otras enterobacterias y bacterias de los géneros Staphylococcus y Streptococcus.

**GRÁFICO 12. CULTIVO DE LA PRIMERA TOMA DE MUESTRAS
POR CYTOBRUSH (CB)**



Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

**CUADRO 7. CULTIVO DE LA SEGUNDA TOMA DE MUESTRAS
POR CYTOBRUSH (CB)**

Nº	MICROORGANISMO AISLADO	NÚMERO DE ANIMALES INFECTADOS
1	Staphylococcus aureus	3
2	Enterococcus faealis	0
3	Streptococcus gama hemolíticos	3
4	Cándida Álbicans	0
5	E. Coli	0
6	Bacillus spp	1
7	Coliformes	1
8	Streptococcus agalactiae (beta hemolíticos)	1
9	Staphylococcus epidermidis	2
10	Acynetobacter spp	1

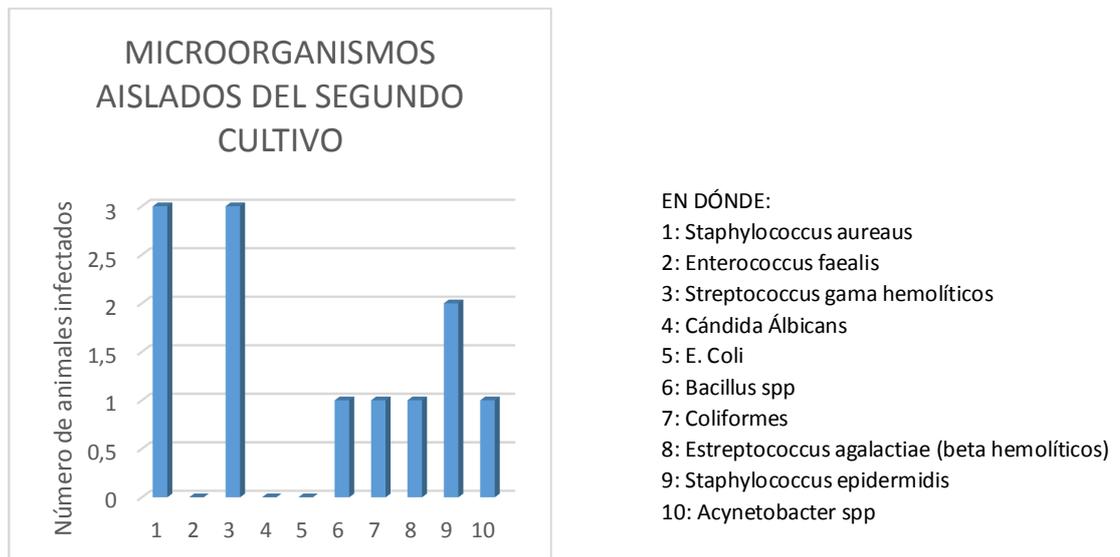
Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

3.7. Interpretación del cultivo de la segunda toma de muestras por Cytobrush (CB)

En lo que respecta al segundo cultivo, nos muestra que se aislaron 7 microorganismos a partir de la muestra recolectada de los animales reportados como no gestantes, por el método de Cytobrush, siendo el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus* gama hemolíticos los microorganismos predominantes, mientras que el *Bacillus* spp, el Coliformes, el *Streptococcus agalactiae* (beta hemolíticos) y el *Acinetobacter* spp fueron los microorganismos menos encontrados, como nos muestra en el Cuadro 7. MARTÍNEZ, *et al.*, 2006, manifiestan que en el endometrio de vacas clínicamente sanas se ha podido demostrar que los microorganismos residentes actúan como un factor de defensa primaria del huésped siendo probable que pueda protegerlo de la invasión de gérmenes patógenos por mecanismos de competición.

GRÁFICO 13. CULTIVO DE LA SEGUNDA TOMA DE MUESTRAS POR CYTOBRUSH (CB)



Fuente: Directa

Elaborado por: Joffre Masaquiza, 2015.

CUADRO 8. RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA REALIZADO A PARTIR DEL CYTOBRUSH

SENSIBLE	Cefalexina, Cefuroxima, eritromicina, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulámico, ceftiofur
INTERMEDIO	Oxytetraciclina, tetracilina, doxyciclina
RESISTENTE	Ampicilina, amoxicilina, penicilina, enrofloxacina, gentamicina
	<i>(4 Muller Hilton)</i>

Fuente: ANIMALAB, 2015

3.8. Interpretación del antibiograma realizado a partir del Cytobrush

Para la interpretación del antibiograma realizado por la toma de muestras por Cytobrush, se escogió los fármacos más comunes de todos los resultados que se obtuvieron, en lo que se refiere a sensibilidad (Cefalexina, Cefuroxima, eritromicina, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulámico, ceftiofur), intermedio (Oxytetraciclina, tetracilina, doxyciclina) o resistencia (Ampicilina, amoxicilina, penicilina, enrofloxacina, gentamicina), a los diferentes medicamentos que el mercado nos ofrece, con lo que se realizó el tratamiento específico y diferenciado a los animales reportados como positivos a endometritis. Cuadro 8.

CONCLUSIONES

- La técnica del Cytobrush (citología endometrial), es una técnica sencilla, práctica y muy confiable para el diagnóstico de endometritis, pudiendo ser utilizada fácilmente en trabajos regulares de campo.
- El grado de inflamación va en función de la presencia de Polimorfonucleares neutrófilos sobre las células epiteliales presentes en el endometrio (células residentes normales).
- El porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos obtenidos del Cytobrush, en promedio de la primera toma de muestras es del 9%, mientras que de la segunda toma de muestras, post tratamiento, en promedio es del 4%.
- En la primera toma de muestras por Cytobrush la prevalencia de endometritis de un total de 38 vacas es del 36,8%, de los cuales 28,6% corresponden a endometritis subclínica y el 71,4% corresponden a endometritis clínica. En la segunda toma de muestras por Cytobrush, post tratamiento, de un total de 14 vacas el 50% corresponde a endometritis, de los cuales el 71,4% a endometritis subclínica y el 28,6% a endometritis clínica.
- En cuanto a los resultados de laboratorio obtenidos en el primer cultivo, nos muestra que se aislaron 8 microorganismos a partir de la muestra recolectada de los animales reportados como no gestantes, por el método de Cytobrush (citología endometrial), siendo el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus* gama hemolíticos los microorganismos predominantes, mientras que el *Enterococcus faecalis* y *E. Coli* fueron los microorganismos menos encontrados en los animales en investigación; en lo que respecta al segundo cultivo, nos muestra que se aislaron 7 microorganismos, siendo el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus* gama hemolíticos los microorganismos predominantes, mientras que el *Bacillus* spp, el Coliformes, el *Streptococcus agalactiae* (beta hemolíticos) y el *Acinetobacter* spp, fueron

los microorganismos menos encontrados en los animales en investigación. Mientras que en el antibiograma realizado por la toma de muestras por Cytobrush, se escogió los fármacos más frecuentes de todos los resultados que se obtuvieron, en lo que se refiere a sensibilidad (Cefalexina, Cefuroxima, eritromicina, gentamicina, amoxicilina + ácido clavulámico, ceftiofur), intermedio (Oxytetraciclina, tetracilina, doxyciclina) o resistencia (Ampicilina, amoxicilina, penicilina, enrofloxacina, gentamicina), a los diferentes medicamentos que el mercado nos ofrece.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda trabajar con la técnica del Cytobrush (citología endometrial), ya que es una técnica sencilla, práctica y muy confiable para el diagnóstico de endometritis, pudiendo ser utilizada fácilmente en trabajos regulares de campo, previa a la IATF y si en el chequeo ginecológico se encontrara alguna anomalía reproductiva, o según el caso lo amerite.
- Se recomienda el uso del chemis para evitar contaminaciones internas al momento del IATF, y así evitar algún tipo de inflamación en el interior del aparato reproductor femenino bovino de nuestros animales.
- Se recomienda tener un buen manejo reproductivo de nuestros animales, para evitar complicaciones reproductivas con la aparición de células inflamatorias como son los Polimorfonucleares neutrófilos a nivel del endometrio en nuestros animales.
- Se recomienda hacer la técnica del Cytobrush, en animales reportados con problemas reproductivos para conocer su prevalencia, tomando en cuenta siempre las medidas de asepsia correspondientes, con el uso de los materiales adecuados y estériles para mejorar la técnica.
- Se recomienda llevar fresca la muestra y en condiciones apropiadas para el análisis de laboratorio del cultivo y antibiograma.

BIBLIOGRAFÍA

1. **BONDURANT, R.H.** *Inflammation in the bovine female reproductive tract.*
2. **BRITO. 2012.** Control de la Reproducción e infecciones puerperales. 2012.
3. **CAMPERO, C., CONOSCIUTO, G., ODRIOZOLA, E., MOREIRA, A., LODEIRO, R., BOISSOU, R.G. 2008.** Hallazgos clínicos bacteriológicos e histopatológicos en vacas lecheras asociados con problemas reproductivos. [En línea] 2008.
4. **CATENA M., CABODEVILLA J. 2006.** Evaluación de semen bovino congelado Taurus. [En línea] 2006.
5. **CATENA, M y J, CABODEVILA.** *Evaluación de semen bovino congelado Taurus.*
6. **COLIN, P. 2008.** ENDOMETRITIS EN VACAS LECHERAS. [En línea] 2008.
7. **DOHOO, I., MARTIN, W., STRYHN, H. 2009.** Veterinary epidemiology research. [En línea] 2009.
8. **DUCHENS, M. 2010.** *Ciclo estral de la hembra bovina.* [Departamento fomento de la producción animal] Chile : Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, 2010.
9. **ELI, M.** Manual de reproducción en ganado vacuno. Zaragoza : Servet.
10. **GÁZQUEZ A., BLANCO, A. 2004.** Tratado de Histología Veterinaria. España : Barcelona, 2004.
11. **HAFEZ, E y B HAFEZ. 2005.** Reproducción e inseminación artificial en animales. s.l. : McGraw Hill, 2005.

12. **HAFEZ, 2002. E.S.E. REPRODUCCION E INSEMINACIÓN ARTIFICIAL en animales.** México : HAFEZ B.
13. **KASIMANICKAM, R y DUFFIELD, T.F., FOSTER, R.A., GARTLEY, C.J., LESLIE, K.E., WALTON, J.S., JOHNSON, W.H. 2007.** Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. [En línea] 2007.
14. **KASIMANICKAM, R., DUFFIELD, T.F., FOSTER, R.A., GARTLEY, C.J., LESLIE, K.E., WALTON, J.S. 2005.** A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. [En línea] 2005.
15. **LEBLANC et al, S.J., DUFFIELD, T.F., LESLIE, K.E., BATEMAN, K.G., KEEFE, G.P., WALTON, J.S., JOHNSON. 2002.** The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. [En línea] 2002.
16. **LEDESMA, M. 2012.** Laboratorio de análisis clínico. 2012.
17. **MAURINO A, . 2012.** PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA ANTES Y CUATRO HORAS DESPUÉS DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL EN VAQUILLONAS. *INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL CÓRDOBA (IRAC)*. [En línea] 2012.
18. **McENTEE, K.** The female genital system. in Pathology of Domestic Animals. [En línea] http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_47.pdf.
19. **PREVALENCIA DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA ANTES Y CUATRO HORAS DESPUÉS DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL EN VAQUILLONAS. MAURINO et al, A., BERNARDI, S., RINAUDO, A., MARINI, P.R. 2012.** Universidad Nacional de Rosario, Argentina : s.n., 2012.

20. **QUINTELA et al, DIAZ, C. HERRADÓN, P. PEÑA, M. BECERRA, J. 2006.** Ecografía y reproducción en vaca. Santiago de Compostela, España : s.n., 2006.
21. **RESTREPO, A. 2015.** CULTIVO (microbiología). [En línea] 2015.
22. **RIVAS, Cristina. 2012.** Fisiopatologías Reproductivas del Bovino. [En línea] 2012.
23. **RODRIGUEZ-MARTINEZ, . H. MCKERNNA, D., WESTON, P.G., WHITMORE, H.L., GUSTAFSSON, B.K. 2007.** Uterine motility in the cow during the estrus cycle. [En línea] 2007.
24. **RYSANECK, M. 2013.** Conferencia sobre trastornos inflamatorios del tracto reproductor femenino en bóvidos. [En línea] 2013.
25. **SALAZAR et al, A. NAVARRO, J. PALLARÉS, F. 2012.** Citología e Histología Veterinaria. [En línea] Universidad de Murcia, 2012. <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema33-reproductor-femenino-ii.pdf>.
26. **SHELDON I.M., LEWIS, S.L., LeBLANC, S., GILBERT, R.O. 2004.** Defining postpartum uterine disease in cattle. 2004.
27. **SHELDON, I.M., RYCROFT, A.N. y ZHOU, C. 2006.** *Association between postpartum pyrexia and uterine bacterial infection in dairy cattle.*
28. **SISSON et al, S., GROSSMAN, JD., GETTY, R. 2005.** Anatomía de los animales domésticos. 5ta Edición. Barcelona España : Masson S.A., 2005.
29. **VALLEJO D., CHAVEZ C., ASTAÍZA J., BENAVIDES C., JURADO X. 2014.** Endometritis subclínica diagnosticada mediante cytobrush y comportamiento reproductivo en vacas del Municipio de Pupiales, Colombia. [En línea] 2014.

ANEXOS

ANEXO N° 1. Cultivo y antibiograma de muestras recolectadas por Cytobrush.



M.V.Z. Hernán Calderón
Director ANIMALAB

CENTRO DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO VETERINARIO
"ANIMALAB CIA. LTDA."

Direc.: Av. Pablo Guarderas y Nardos (Frente a la AGSO)
Telfs.: Of. 2310 902 / Cel.: 0984 484 385 / 0997 984 371 • Mail: c.d.c.v.animalab@hotmail.com
Machachi - Ecuador

IDENTIFICACION: 6753
MUESTRA: Secreción Endometrial
EXAMEN: Cultivo y Antibiograma

TINCIÓN	Polimorfonucleares	Escasos
	Células Pavimentosas	(+)
	Cocos gram positivos	(+)

CULTIVO	As/Mck/Cled/Sab
GERMEN AISLADO	1. <u>Crecimiento Moderado de</u> <u>Enterococcus faecalis</u> 2. Crecimiento Escaso de Streptococcus gama hemolítico

Hematíes 5-8 x Campo

ANTIBIOGRAMA	
SENSIBLE	Amoxicilina + Ácido clavulámico, Amoxicilina, Ampicilina, Ampicilina+Sulbactam, Imipenem, Vancomicina, Netilmicina, Gentamicina, Amikacina, Sisomicina, Neomicina (P).
INTERMEDIO	Streptomina, Clindamicina, Oxytetraciclina, Tetraciclina, Sulfatrimetoprim, Doxyciclina.
RESISTENTE	Cefuroxima, Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefataxina, Cefalexina, Cefalozina, Cefalotina, Cefaclor, Cefadroxilo, Cefadrina, Penicilina (T) Kanamicina (T), Cefmetazole, Ceotetán, Ácido Nalidixico

(4 Muller Hilton)



M.V.Z. HERNAN CALDERON
GERENTE GENERAL 'ANIMALAB CIA. LTDA'



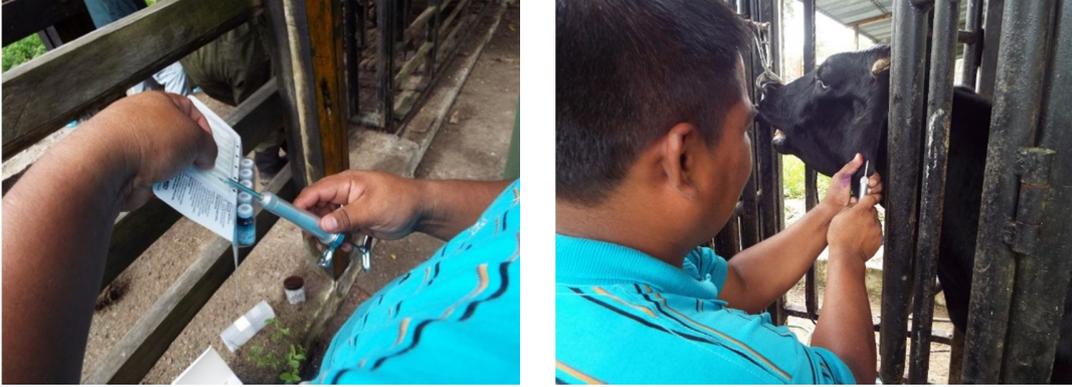
ANEXO N° 2. Vaconas utilizadas para el trabajo de investigación



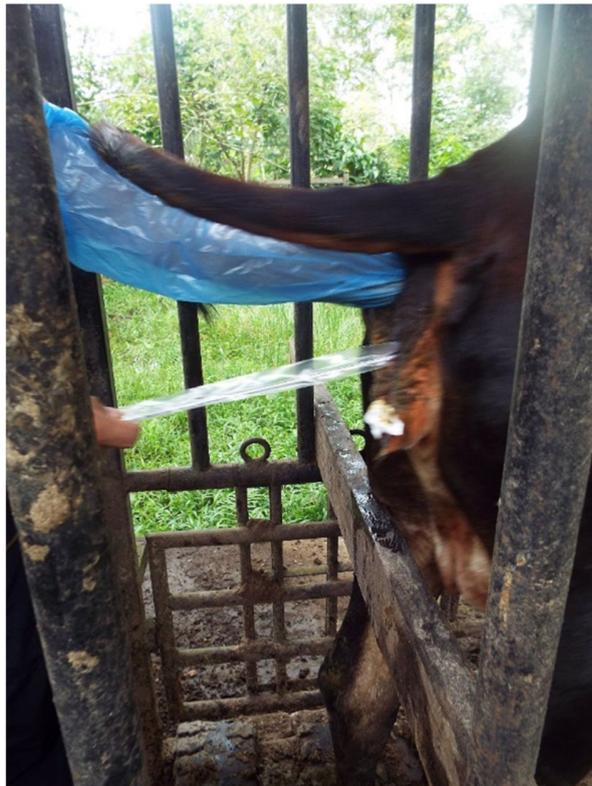
ANEXO N° 3. Chequeo ginecológico, bajo la supervisión del Dr. Roberto Quinteros,
responsable Programa Bovino UEA



ANEXO N° 4. Sincronización de celo, utilizando el protocolo Crestar®



ANEXO N° 5. Inseminación artificial a tiempo fijo (IATF)



ANEXO N° 6. Diagnóstico de preñez por ecografía 45 días post inseminación artificial, realizado por Dr. Juan Carlos López (UEA)



ANEXO N° 7. Técnica Cytobrush



**ANEXO N° 8. Frotis Cytobrush, bajo la supervisión del Dr. Pablo Marini, PhD
(Universidad Nacional del Rosario, Argentina)**



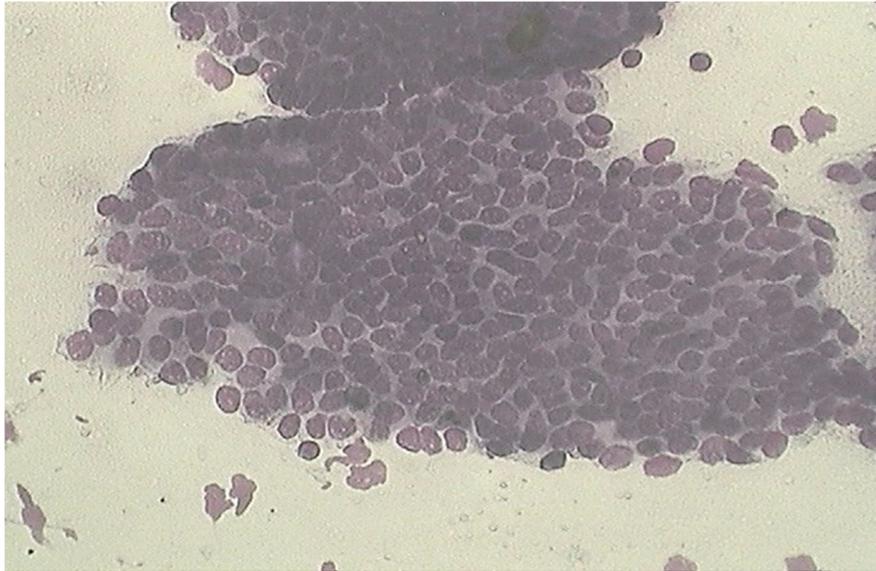
ANEXO N° 9. Realizando la tinción de placas, obtenidos por la técnica de Cytobrush. Tinción 15 (Biopur)



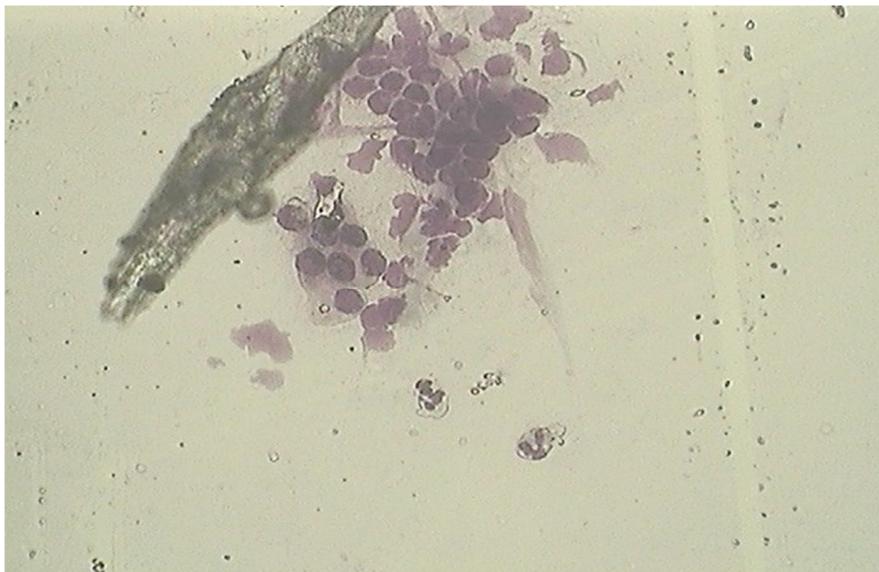
ANEXO N°10. Conteo de PMN n, de placas obtenidas por la técnica de Cytobrush



ANEXO N° 11. Microfotografía óptica. 40x. Tinción 15. Frotis obtenido por Cytobrush. Se observan células epiteliales del endometrio



ANEXO N° 12. Microfotografía óptica. 40x. Tinción 15. Frotis obtenido por Cytobrush. Se observan células Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN n)



ANEXO N° 13. Microfotografía óptica. 100x. Tinción 15. Frotis obtenido por Cytobrush. Se observan células Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN n)



ANEXO N° 14. Visita del tribunal



ANEXO N° 15. Equipo de trabajo

