



Relación entre las características del fondo de extendido de moco cérvico-vaginal bovino y el estatus sanitario uterino

Savia, C.L.^{1,2,3*} ; Algañaraz, A.C.² ; Roca, M.A.² ; Tobin, M.² ; Rinaudo, A.² 
Guibert, E.E.^{1,3} 

¹Centro Binacional (Argentina-Italia) de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC), Universidad Nacional de Rosario, Rosario (2000), Argentina. ²Cátedra de Histología II y Embriología Especial, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario, Casilda (S2170), Argentina. ³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

✉ lucianasavia@fcv.unr.edu.ar

Resumen

El objetivo de este trabajo fue determinar si existe asociación entre el tipo de flujo, las características del fondo de los extendidos de moco cérvico-vaginal (MCV) y el estatus sanitario uterino. Se utilizaron 146 vacas Holando Argentino que se clasificaron en tres grupos, según examen ginecológico y lectura de *cytobrush*: grupo con endometritis clínica (EC), grupo con endometritis subclínica (ES) y grupo con estatus uterino sano (S). Para la lectura del fondo se colocó una gota de MCV sobre un portaobjetos, se dejó secar hasta que cristalizó y se observó a microscopio óptico. El fondo se clasificó en sucio (Su) o limpio (L) según la presencia o ausencia de detritus, células epiteliales e inflamatorias. El tipo de flujo normal se clasificó en transparente o turbio. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software GraphPad® Prism5. Se aplicaron pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas, prueba de sensibilidad, prueba de especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y razón de verosimilitud. En el grupo sano el 85% de la lectura fue fondo tipo limpio y un 15% Su, grupo ES el 42% fondo limpio y 58% sucio, en el grupo EC 7% fondo tipo limpio y 93% sucio. La aplicación de la prueba de lectura de fondo de extendido como técnica diagnóstica presentó alta especificidad (93%) y sensibilidad (85%) para EC y alta especificidad (85%), baja sensibilidad (58%) para ES. Se encontró asociación entre los tipos de fondo y el estatus uterino, ya que el fondo sucio se asoció a muestras de MCV de vacas con endometritis y a un mayor porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos en muestras de citologías endometrial. El flujo transparente se asoció con fondo limpio de extendido y el turbio con fondo sucio. En conclusión, la lectura del fondo de extendido de MCV es una técnica rápida, sencilla y económica que podría utilizarse a campo para evaluar las características de la salud uterina de la hembra.

Palabras clave: moco cérvico-vaginal, salud uterina, bovinos, endometritis, extendido.

Relationship between the background of spread bovine cervical-vaginal mucus characteristics and uterine sanitary status

Abstract. The objective of this study was to determine whether there is an association between the type of cervical-vaginal mucus (MCV), the characteristics of the smear background, and uterine health status. A total of 146 Holando Argentino cows were classified into three groups based on gynaecological examination and *cytobrush* results: clinical endometritis (EC), subclinical endometritis (ES), and healthy uterine status (S). For smear background analysis, a drop of MCV was placed on a slide, allowed to dry until crystallization, and observed under an optical microscope. The background was classified as clean (L) or dirty (SU) based

on the presence or absence of debris, epithelial cells, and inflammatory cells. Normal flow was categorized as transparent or cloudy. Data were statistically analyzed using GraphPad® Prism 5 software. Parametric and non-parametric tests were applied, along with sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and likelihood ratio. In the healthy group, 85% of the samples showed a clean background and 15% a dirty background. In the ES group, 42% had a clean background and 58% a dirty background, while in the EC group, 7% exhibited a clean background and 93% a dirty background. The smear background reading test, applied as a diagnostic technique, demonstrated high specificity (93%) and sensitivity (85%) for EC, and high specificity (85%) but low sensitivity (58%) for ES. An association was found between smear background types and uterine status, with dirty backgrounds correlating with MCV samples from cows with endometritis and a higher percentage of polymorphonuclear neutrophils in endometrial cytology samples. Transparent discharge was associated with a clean smear background, while cloudy discharge was linked to a dirty background. In conclusion, MCV smear background reading is a rapid, simple, and cost-effective technique that could be used in the field to assess uterine health in female cattle.

Key words: cervical-vaginal mucus; uterine health, cows, endometritis, spread.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción lechera persiguen como uno de sus principales objetivos alcanzar la máxima rentabilidad productiva y por ende económica, tanto del rodeo en general como de cada una sus vacas en particular (Savia et al. 2021). Las afecciones uterinas reducen la fertilidad e incrementan los descartes por lo cual es de suma importancia para la empresa lechera el diagnóstico de las mismas (Gilbert 2016). El período posparto es crucial en la vida reproductiva de la hembra, ya que influye significativamente en su futura eficiencia reproductiva. Las enfermedades uterinas, principalmente las infecciones inespecíficas, son la causa más común de infertilidad y contribuyen de manera significativa a las pérdidas económicas de la industria lechera (Villacrés Barrionuevo 2016). La metritis y endometritis se han relacionado con retrasos en el reinicio de la actividad ovárica postparto, el incremento del intervalo entre el parto y la primera inseminación, el aumento de los días abiertos, el descenso de la tasa de concepción y el aumento de las tasas de eliminación de hembras bovinas (Quintela et al. 2017). El desarrollo de las enfermedades uterinas depende de la virulencia del patógeno y de su capacidad para superar la tolerancia y la resistencia del animal (Sheldon et al. 2019). Muchos factores influyen en este equilibrio, incluidos la genética y el medio ambiente, pero el desarrollo de la enfermedad uterina se ve facilitado especialmente por factores de riesgo de tipo ambientales (Sheldon et al. 2019). La endometritis se define como la inflamación del endometrio (Gilbert 2016), cuando se desarrolla a partir de los 21 días postparto y presenta descarga de tipo purulenta o mucopurulenta se denomina endometritis clínica (EC) (Sheldon et al. 2019). Por otro lado, la endometritis subclínica se caracteriza por la inflamación del endometrio en ausencia de signos clínicos (Sheldon et al. 2019), por lo cual la descarga es normal y la principal característica de la endometritis subclínica (ES) es la presencia de polimorfonucleares neutrófilos (PMN N) en la mucosa uterina (Quintela et al. 2017). En la endometritis la mucosa uterina se encuentra comprometida, ya que se infecta e inflama, lo cual conlleva a un aumento en el número de células plasmáticas, neutrófilos y linfocitos en el útero, siendo los neutrófilos el principal tipo de leucocito reclutado al órgano en respuesta al proceso inflamatorio, por lo cual actúan como primera línea de defensa (Van Schyndel et al.

2018). Para el diagnóstico de ES la citología es la técnica de elección o “*Gold Standar*” (Quintela et al. 2017). Cuando la proporción de neutrófilos excede los umbrales definidos por el operador, generalmente aproximadamente el 5% PMN N, en muestras recolectadas mediante lavado del lumen uterino o mediante citocepillado endometrial, de 3 a 9 semanas después del parto, se diagnostica la hembra bovina como positiva a ES (Sheldon et al. 2019). La técnica de *cytobrush* presenta las siguientes ventajas sobre el lavado uterino: es más consistente, más rápida, no deja residuos líquidos en la luz uterina y permite obtener una muestra con células de morfología conservadas (Savia 2023). El inconveniente es que, si bien el *cytobrush* es un método más pragmático y rápido de realizar que el lavado uterino, no es práctico en condiciones de campo (LeBlanc 2008), ya que se necesita realizar una serie de pasos para arribar al diagnóstico; toma de muestra, fijación del preparado, tinción y lectura mediante conteo de células inflamatorias (Savia 2023), por este motivo no se implementa en forma rutinaria en el control reproductivo en rodeos comerciales, lo que conlleva a que la ES sea subdiagnosticada (Van Schyndel et al. 2018). Por lo tanto, es necesario contar con técnicas que aporten información sobre el estado uterino de las vacas que sean rápidas, confiables y que puedan realizarse en el establecimiento.

El moco cérvico-vaginal (MCV) puede recolectarse de forma fácil y rápida, no ocasiona daños inflamatorios en la mucosa uterina y no requiere de capacitación especial para la toma de muestra. Además, aporta mucha información sobre la condición del tracto reproductor, por lo cual tiene un gran potencial como fuente de biomarcadores para patologías del aparato genital femenino y animales (Zegels et al. 2010, Van Raemdonck et al. 2014, Adnane et al. 2018a). Es un hidrogel producido de forma continua por las células epiteliales de las criptas cervicales y el epitelio vaginal anterior. El MCV tiene importantes funciones; inmunológica (posee factores antibacterianos como Inmunoglobulina A, lactoferrina y lisozima), humedece y lubrica la mucosa del tracto reproductor, actúa como barrera selectiva de espermatozoides e interviene en el proceso de fertilización modulando la reacción acrosómica (Cortés et al. 2016, Adnane et al. 2018a). Al realizar el extendido de una gota de MCV, se puede observar el fenómeno de cristalización que ocurre al desecar el moco, en el cual se forman arreglos geométricos. Este fenómeno se da en sustancias que poseen proteínas

y electrolitos, como por ejemplo la saliva y ocurre por un cambio de solución líquida a sólida, que precipita en forma de cristales (Cortés et al. 2014). El primer autor en abordar esta temática fue Papanicolau (1946), el cual describió la relación entre el tipo de cristales observados y el momento de la ovulación en mujeres (Cortés et al. 2014). Posteriormente, Abusineina (1962), tomó en cuenta la forma de los cristales y desarrolló una clasificación para el ganado bovino, proponiendo una cristalización de tipo A, B y C, la cual relacionó con las características del MCV y estado hormonal de la hembra (Cortés et al. 2014). Otra clasificación vigente de este fenómeno es la descrita por Bishnoi y Vyas (1982) y utilizada por Tsiligianni et al. (2000), en numerosos estudios en hembras bovinas, la cual se basa en una escala del 0 al 4. El fenómeno de cristalización se encuentra regulado por la concentración de hormonas sexuales en sangre, siendo máxima en el momento cercano al estro, debido a que el estrógeno estimula la cristalización y la progesterona la suprime (Cortés et al. 2014), por lo cual se ha utilizado el estudio de los patrones de arborización para determinar el momento óptimo de inseminación en mujeres y animales (Tsiligianni et al. 2000, Savia et al. 2016, Bernardi et al. 2018).

En los preparados de citologías en la clínica veterinaria, la observación del fondo del preparado en diferentes tipos de muestras se utiliza para visualizar la presencia de detritus, células inflamatorias o bacterias, lo cual aporta datos importantes para arribar al diagnóstico, como por ejemplo en los extendidos de citología vaginal exfoliativa en perras para detectar si hay presencia de vaginitis o en extendidos de líquidos de punción para evaluar el tipo de células presentes. Si bien existen estudios en el MCV sobre su celularidad, cristalización, su relación con el ciclo estral y características del fluido con la salud uterina de la vaca, no hay reportados estudios sobre las características del fondo de extendido de MCV y su relación con endometritis clínica y subclínica.

El objetivo de este trabajo fue determinar si las características del fondo de los extendidos de MCV se asocian con el estatus uterino sanitario y el tipo de flujo obtenido.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó utilizando tres establecimientos lecheros semi-intensivos de la Cuenca lechera de Santa Fe sur, Argentina, con una producción promedio de 20 litros por vaca por día. Las muestras se tomaron en el periodo que abarca desde julio 2017 a diciembre 2021.

Se utilizaron 146 hembras bovinas Holando Argentino de 1 o más lactancias, con 21–60 días postparto. Las mismas presentaban buena condición corporal y ausencia de anomalías en el tracto reproductor. Las vacas se clasificaron según examen ginecológico (realizado mediante tacto rectal y ecografía), tipo de mucus

recolectado y lectura de *cytobrush* en tres grupos: sanas, con endometritis clínica y con endometritis subclínica.

Técnica de *cytobrush* y recolección de mucus. Para la toma de muestra de la citología endometrial y recolección de flujo, se utilizó un dispositivo adaptado para tal fin, que consistió en una pistola de inseminación con un cepillo endocervical (Medibrush® XL) cortado a 5 centímetros de largo y enroscado en su extremo. La toma de muestra de citología endometrial se realizó según la técnica descrita por Kasimanickam et al. (2004). El instrumento se colocó en una vaina de plástico sanitaria para protegerlo de la contaminación vaginal, posteriormente la vulva se limpió con toallas de papel húmedas y el dispositivo se pasó a través de la vagina hasta el cuello uterino. Una vez que el instrumento pasó el cuello uterino y se ubicó en el cuerno mayor del útero, el cepillo fue expuesto de la vaina y rotado en el mismo sentido de las agujas del reloj sobre la mucosa uterina. La toma de muestra de flujo y cepillado se realizaron conjuntamente ya que para ambas era necesario introducir la pistola en el cérvix. Luego se retrajo el cepillo dentro de la vaina y se retiró la pistola de inseminación del útero. En este momento se procedió a la toma de muestra de MCV, ya que la vaina plástica se dejó en el interior del útero y se acopló a una jeringa de 60 mL, con la cual se ejerció una aspiración suave. Luego las muestras de MCV se colocaron en tubos tipo eppendorf y se transportaron al laboratorio para su análisis refrigeradas en cajas de transporte, dentro de las 6 horas de su extracción y posteriormente fueron procesadas en el día.

Como se describió anteriormente el cepillo se exteriorizó previo a la toma de MCV, se rotó sobre un portaobjetos limpio, el preparado se fijó y almacenó en una caja transportadora. Luego la muestra del extendido endometrial fue remitida dentro de las 6 horas al laboratorio en cajas transportadoras y se coloreó utilizando una tinción de tipo panóptica (Tinción 15®, Biopur, Argentina). La lectura se realizó el mismo día de la toma de muestra.

Lectura de las muestras endometriales. Las citologías coloreadas fueron observadas con un microscopio óptico binocular de campo claro (Leica DM750®). Se realizó un conteo de 200 células totales, identificando células endometriales e inflamatorias (Figura 1) a 400X aumentos. Para determinar el grado de inflamación se utilizó la siguiente fórmula (Rinaudo et al. 2011):

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

% PMN N: Porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos
 n PMN N: Cantidad de Polimorfonucleares Neutrófilos presentes en la preparación
 C. T: Células Totales presentes en la preparación (células epiteliales y PMN N)

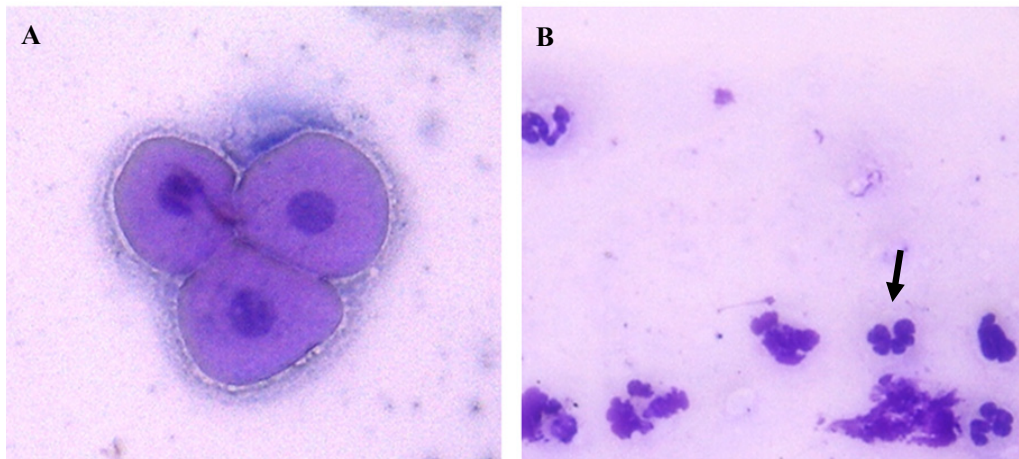


Figura 1. Microfotografía óptica de extendido endometrial. A) se observan células epiteliales endometriales. B) se observan polimorfonucleares neutrófilos (flecha negra). Magnificación: 400X, Tinción 15[®], Biopur, Argentina.

Clasificación del flujo. El MCV se clasifica en flujo tipo 0, 1, 2 y 3 (Runciman et al. 2009) (Tabla 1). El flujo tipo 0 se dividió para su estadio según su aspecto en Transparente (Tr) y Turbio (T) (Tabla 1). Se estudió la relación entre el tipo de flujo obtenido y el estatus sanitario uterino.

Tabla 1. Clasificación del moco cérvico vaginal según sus características macroscópicas.

MCV	Características	Transparente	Turbio
0	moco claro, con ausencia de pus	aspecto transparente al observarlo a luz directa.	presenta turbidez al observarlo a la luz directa.
1	moco con flóculos de pus ($\leq 50\%$)	-	-
2	moco con flóculos de pus ($\geq 50\%$)	-	-
3	descarga enteramente purulenta y/o purulenta sanguinolenta, color rojo-amarronado, puede estar asociada a olor fétido.	-	-

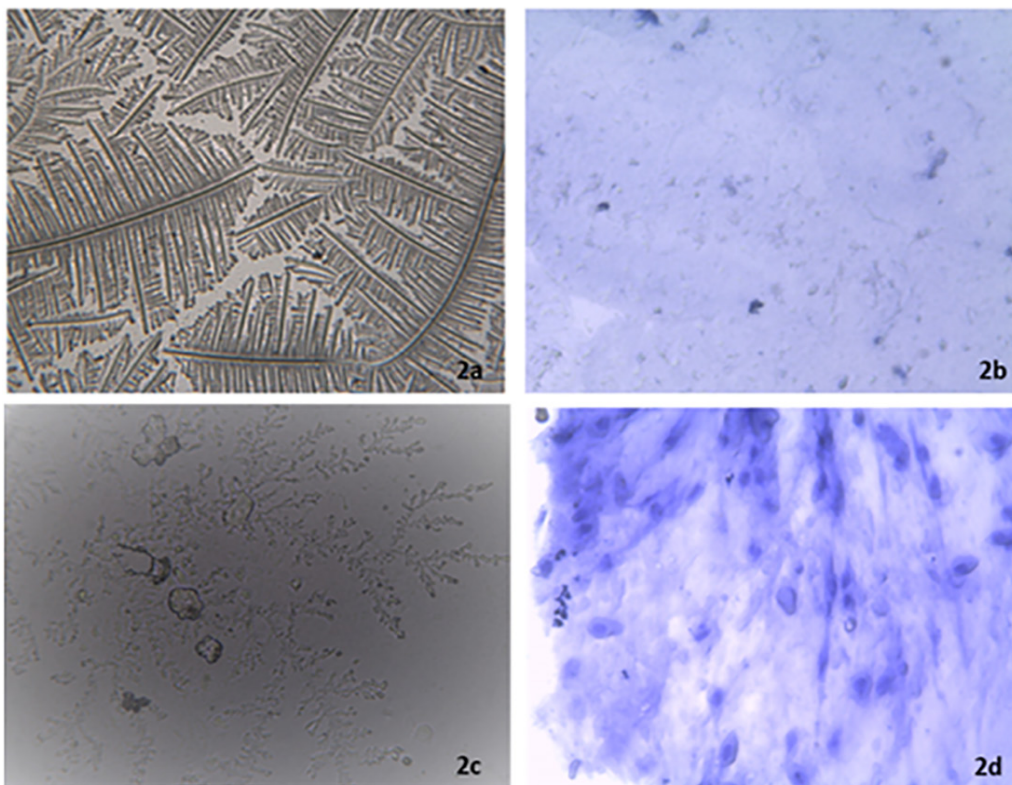


Figura 2. Imagen de extendido de MCV. Extendido de gota de MCV con fondo limpio (2a) 100X. Extendido con fondo sucio (2c) 100X. Tinción con Hematoxilina de extendido con fondo limpio (2b) y de extendido con fondo sucio (2d), en el cual se visualizan células, PMN N y detritus, 400X. El preparado de fondo limpio corresponde a una hembra bovina con estatus uterino sano y el preparado de fondo sucio a MCV de una hembra con endometritis subclínica.

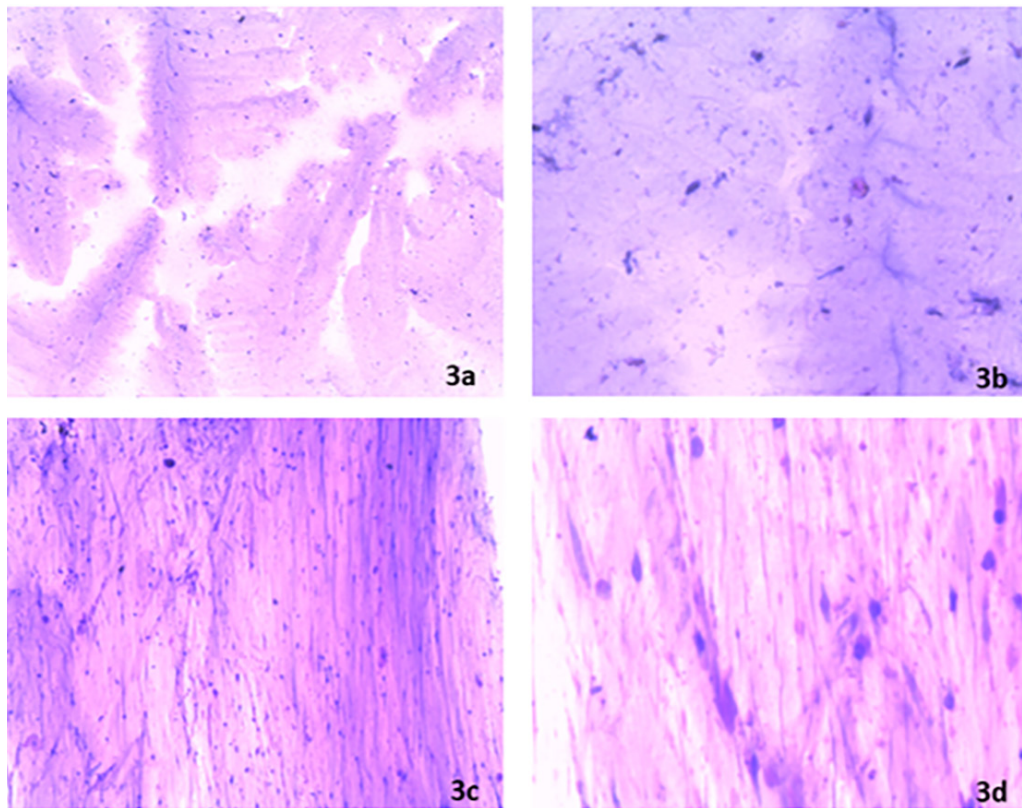


Figura 3. Imagen de extendido de MCV, tinción con Hematoxilina - Eosina. Extendido de gota de MCV con fondo limpio (3a) 100X. Extendido con fondo sucio (3c) 100X. Extendido con fondo limpio (3b), en el cual se observan a 400X estructuras que conforman los cristales teñidos con coloración basófila. Extendido de fondo sucio (3d) visualizado a 400X, en el cual se visualizan células, PMN N y detritus.

Lectura de fondo de extendido de MCV. Una gota de moco fresco se extendió sobre un portaobjeto limpio y seco. Se dejó secar al aire por 30 minutos y posteriormente se realizó la lectura con el microscopio óptico binocular de campo claro (Leica DM750®), observando en primer lugar con un aumento de 40X y luego 100X para identificar los distintos tipos de cristales y visualizar el fondo del preparado. Se utilizó una clasificación propia (Savia 2023); según el tipo de fondo de extendido en limpio o sucio, de acuerdo a la visualización del fondo, relacionada con la presencia o ausencia de células basales, inflamatorias y detritus en el preparado. Luego las muestras se colorearon con Hematoxilina- Eosina para reconocer estructuras celulares y corroborar la presencia de estas para cada tipo de fondo evaluado sin teñir (Figura 2 y Figura 3).

Fondo Limpio (L). Cuando en el fondo del preparado se observó escasa o nula presencia de detritus y células basales. Se podía visualizar bien formados los cristales o no observarse (Figura 2 y Figura 3).

Fondo Sucio (Su). Cuando en el fondo del preparado se observó gran cantidad de células inflamatorias y detritus celulares. Se pudieron visualizar bien formados los cristales o no observarse (Figura 2 y Figura 3).

Grupos experimentales. Las hembras se clasificaron en tres grupos según el estatus sanitario uterino: grupo sano (S), grupo con endometritis subclínica y grupo con

endometritis clínica. Grupo sano: hembras que presentaron MCV tipo 0 al momento del muestreo y citología endometrial negativa a ES, se utilizó como grupo control. Grupo endometritis subclínica: hembras con MCV 0 y citología endometrial positiva a ES (PMN N \geq 5%) (Gilbert et al. 2005). Grupo endometritis clínica: MCV tipo 1, 2 o 3 con citología compatible con endometritis clínica, se utilizó como control positivo de grupo enfermo.

Análisis estadísticos. Para los análisis de datos se utilizó el software GraphPad® Prism5. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron: Análisis descriptivo, t de Student, Test de Fisher, Chi cuadrado (X^2). Se utilizó la prueba de Sensibilidad (Se), Especificidad (Esp), Valor predictivo positivo (VPP), Valor predictivo negativo (VPN) y Likelihood ratio (LR) o prueba de verosimilitud, para determinar si la técnica propuesta de lectura del fondo de preparado podría utilizarse como método para diagnóstico de endometritis subclínica y endometritis clínica. Se utilizó el test de t de Student para determinar si había diferencias en el % de PMN N asociada a las muestras de fondo sucio y limpio (para este estudio se tomaron los resultados de citología de muestras del grupo S y ES). El test X^2 se aplicó para evaluar si había diferencias en la distribución del tipo de fondo de extendido entre los grupos S, ES y EC. El test de Fisher se utilizó para comparar el tipo de fondo de extendido entre 2 grupos y para cada tipo de flujo (transparente o turbio). El nivel de confianza adoptado para todos los test estadísticos fue del 95%, con un error $\alpha < 0,05$.

Aspectos Éticos. Todos los experimentos descriptos en el presente manuscrito se llevaron a cabo con el permiso del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina (Protocolo N° 146/12).

RESULTADOS

Tipo de MCV y relación con el estatus sanitario uterino. Se recolectaron 146 muestras de moco cérvico-vaginal, de los cuales el 73% de las muestras (n=106) de MCV se clasificaron como flujo tipo 0 y el 27% (n=40) como muestras de flujo de tipo purulento. De las muestras de MCV de flujo tipo 0 el 83% fue transparente y el 17% presentó turbidez. Del flujo transparente el 66% fue de hembras sanas y el 34% de hembras con ES. Del flujo turbio el 61% correspondió a muestras de MCV de hembras sanas y el 39% de hembras con ES. De los flujos purulentos obtenidos (n=40) el 67% fue MCV 1, 33% MCV 2. No se encontró asociación entre el tipo de flujo transparente o turbio con el estatus sanitario uterino sano o ES determinado por *cytobrush* ($p>0,05$).

Lectura de extendidos de grupos experimentales y tipo de flujo. El 85% de los fondos de los extendidos de

MCV de vacas del grupo sano (n=40) presentaron fondo de tipo limpio y el 15% fondo tipo sucio. En cuanto a la relación con el tipo de flujo, de las muestras de MCV tipo limpio el 97% provenía de un flujo transparente y el 3% de flujo turbio, en cambio en el fondo tipo sucio el 34% provenía de flujo transparente y el 66% de un flujo turbio (Tabla 2). Con respecto al grupo de vacas Endometritis subclínica (n=26) el 42% de los fondos de los extendidos de MCV resultaron de tipo limpio y el 58% tipo sucio. El 100% de las muestras de MCV con fondo tipo limpio fueron transparentes y en cuanto al fondo sucio, el 53% provenía de flujo transparente y el 47% de un flujo turbio (Tabla 2). En relación al grupo con Endometritis clínica (n=27) se encontró 7% de los fondos tipo limpio y un 93% de tipo sucio. De las muestras que presentaron fondo tipo limpio, el 100% provenía de un flujo tipo 1 y en muestras con fondo tipo sucio el 60% provenía de un flujo tipo 1 y el 40% de un flujo tipo 2 (Tabla 2). Al comparar los grupos S, ES y EC mediante el test X^2 se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,0001$) entre los porcentajes obtenidos de fondos de preparados. Al aplicar el test de Fisher se encontraron diferencias entre el grupo S y ES ($p<0,0001$), S y EC ($p<0,0001$) y EC vs ES ($p<0,0001$).

Tabla 2. Lectura de fondo de extendidos de MCV de hembras del grupo sano, Endometritis subclínica y Endometritis clínica. Relación entre el tipo de MCV y el fondo de extendido.

	Fondo Limpio			Fondo Sucio		
	S	ES	EC	S	ES	EC
Distribución	34 (85%)	11 (42%)	2 (7%)	6 (15%)	15 (58%)	25(93%)
MCV Transparente	33 (97%)	11 (100%)	0 (0%)	2 (34%)	8 (53%)	0 (0%)
MCV Turbio	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (66%)	7 (47%)	0 (0%)
MCV Tipo 1	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	15 (60%)
MCV Tipo 2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (40%)

Valores expresados en n (%).

Evaluación de la lectura según tipo de flujo 0. En las muestras con flujos tipo 0, de 45 preparados con fondo limpio, el 97% pertenecía a muestras de MCV transparente y solo el 3% a muestras con flujo turbio. En el caso de los preparados con fondo sucio de 21 muestras el 52% provenía de flujo turbio y 48% de flujo límpido (Tabla 3).

Se encontraron diferencias significativas entre el tipo de fondo en el flujo tipo 0, al comparar flujos transparentes y turbios ($p<0,0001$), ya que el flujo transparente se relacionó en mayor proporción al fondo limpio y el flujo turbio se relacionó en mayor proporción a un fondo sucio.

Tabla 3. Lectura de extendidos de MCV de flujo tipo 0. Relación entre el tipo de moco obtenido (transparente o turbio) y la lectura de fondo del preparado.

	Flujo Tipo 0	
	Fondo Limpio	Fondo Sucio
Distribución general	45 (68%)	21 (32%)
MCV Transparente	43 (97%)	11 (52%)
MCV Turbio	2 (3%)	10 (48%)

Valores expresados en n (%).

Análisis de la técnica de lectura de fondo de preparado para el diagnóstico de ES y EC. En muestras de MCV de vacas ES se encontró una sensibilidad del 58% (IC 95%, 48% a 68%), especificidad 85% (IC 95%, 76%

a 91%), VPP 79% (IC 95%, 48% a 86%), VPN 66% (IC 95%, 54% a 71%) y Likelihood Ratio (LR+) 3,86 (regular) para la prueba de la lectura del fondo (Tabla 4). Para vacas EC se encontró una Sensibilidad del 93% (IC 95%, 86% a

97%), Especificidad 85% (IC 95%, 76% a 91%), VPP 86 % (IC 95%, 78% a 92%), VPN 92% (IC 95%, 84% a 96%), Likelihood Ratio (LR +) 6,2 (buena) (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y Likelihood Ratio de la técnica de lectura de fondo de extendido para muestras de MCV de vacas con Endometritis Subclínica y Endometritis Clínica.

	Se	Esp	VPP	VPN	LR
ES	58%	85%	79%	66%	3,86
EC	93%	85%	86%	92%	6,2

Valores expresados en n (%).

Relación entre el tipo de fondo de preparado y el porcentaje de polimorfonucleares neutrófilos. Los extendidos de tipo limpio (n=38) presentaron $1,75 \pm 1,76$ % de PMN N en las citologías endometriales, tomando valores mínimos de 0% y máximo de 6%, mediana 1,5%. Los extendido de tipo sucio (n=21) presentaron $8,76 \pm 6,7$ % de PMN N en las citologías endometriales, tomando valores mínimos de 0,5% y máximos de 23%, mediana 7,5%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el % de PMN N en muestra de moco con fondo limpio y con fondo sucio ($p < 0,0001$) (Figura 4).

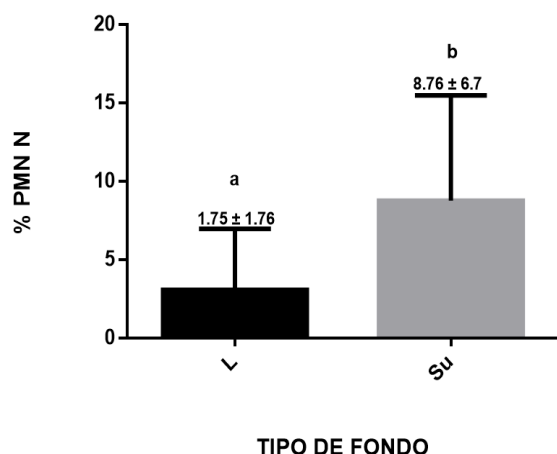


Figura 4. Relación entre el fondo del extendido de moco limpio (L) y sucio (Su), con el porcentaje de PMN N encontrados en las muestras de citología endometrial. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas entre los grupos.

DISCUSIÓN

En la actualidad, en la producción bovina, hay mucha presión de selección sobre los caracteres del macho, en servicios con inseminación artificial o natural, evaluando fertilidad, caracteres heredables a las hijas, motilidad, porcentaje de gametos vivos y anomalías, pero no se tiene en cuenta las características del moco de las hembras (Savia 2023). El MCV juega un papel clave en la reproducción ya que aloja, nutre, transporta y selecciona a los gametos masculinos que van a fecundar al ovocito. Este fluido es una fuente de información sobre el ambiente

uterino debido a que las características del MCV como pH, apariencia y viscosidad son herramientas útiles para predecir la fertilidad de las hembras bovinas (Tsiligianni et al. 2001, Abd-ElHafeez et al. 2020). Este es el primer estudio reportado que describe la evaluación del fondo de extendido de MCV de vacas y su relación con el ambiente uterino.

La endometritis subclínica es una enfermedad que produce una disminución del rendimiento reproductivo en las vacas afectadas (Barnes et al. 2023). Las hembras bovinas que cursan con ES presentan inflamación en la mucosa uterina y un característico infiltrado de PMN N en útero, pero no hay presencia de exudados por vulva, por lo cual es de esperarse que el moco no presente las mismas características de vacas con descargas de tipo purulenta, que cursan con endometritis clínica. Asimismo, tampoco comparte las características con vacas de estatus uterino sano, comportándose como un estado intermedio, en el cual se observa mayor descamación, células inflamatorias y detritus en el fondo del preparado que en los preparados de vacas sanas, pero que no llega a presentar las características de vacas con EC, lo cual es un problema para los sistemas productivos lecheros, ya que no puede diagnosticarse por métodos utilizados de rutina por el operario como la técnica de mano enguantada, vaginoscopia o metricheck (Quintela et al. 2017). Por lo tanto, son necesarios métodos específicos como el *cytobrush* (Quintela et al. 2017) para arribar a su diagnóstico, técnica que requiere tiempo y capacitación del operador, para la obtención y lectura de la muestra. Por ello, el estudio del MCV es una herramienta útil que puede aportar datos rápidos y confiables sobre la salud uterina de las vacas. En este ensayo se encontraron todos los tipos de flujo, MCV purulento y con ausencia de pus. El flujo tipo 0 se visualizó transparente y turbio. En los preparados se observaron diferentes grados de cristalización, ya que dependió del estado del ciclo en el que se encontraba cada hembra muestreada, en la cual se observaron cristales típicos y atípicos, y no se observó una alteración de la formación de cristales en aquellas muestras que presentaron fondo sucio, por lo cual la presencia de detritus y descamación no afectaría el fenómeno de nucleación para la formación de cristales. Al analizarse el tipo de fondo, se encontró mayor porcentaje de fondo sucio en las muestras de los grupos con endometritis que en las hembras con estatus uterino sano. En extendidos de MCV que presentaron fondo sucio en preparados sin teñir se visualizó un puntillado del fondo con presencia de elementos celulares y detritus, que fueron luego confirmados con la tinción de hematoxilina, la cual permitió visualizar núcleos y componentes celulares como retículo endoplásmico rugoso de una coloración basófila y con tinción eosina que ofreció el contraste, tiñendo organelas citoplasmáticas de un color rosado. La tendencia a que los grupos con inflamación uterina presenten un mayor porcentaje de fondo sucio puede contribuir a la interpretación del estado de la salud uterina por parte del operador, ya que es una técnica rápida, fácil, económica, no necesita tinción y requiere pocos instrumentos (microscopio, portaobjetos), por lo cual puede realizarse al lado de la vaca y ofrecer información relevante para tomar decisiones, por ejemplo en cuanto a la elección de inseminar con un semen de mayor o menor valor.

En las muestras de MCV del flujo tipo 0, el flujo transparente se asoció a un mayor porcentaje de fondo limpio y el flujo turbio al fondo sucio. Se ha reportado una relación negativa entre la turbidez del flujo y la fertilidad (Abd-ElHafeez et al. 2020), ya que vacas con moco cervical transparente, delgado y de pH óptimo (7-7,5) al momento de la inseminación artificial, obtuvieron mayor tasa de concepción que vacas con moco con apariencia opaca o sucia (Abd-ElHafeez et al. 2020). Además, en flujos opacos se encontraron valores aumentados de proteínas totales y colesterol, y valores menores de glucosa que podrían modular negativamente la concepción (Abd-ElHafeez et al. 2020). Se reportó asociación entre moco recolectado al momento del estro, claro, fino y alcalino con vacas que resultaron preñadas y moco turbio, espeso con vacas repetidoras (Modi et al. 2011). El moco en el momento del celo que es claro, transparente conduce al gameto masculino favoreciendo su transporte, en cambio el flujo turbio afecta la movilidad del espermatozoide (Modi et al. 2011, Lim et al. 2014, Abd-ElHafeez et al. 2020), por lo cual la obtención de una muestra de MCV con fondo de extendido de tipo sucio podría estar relacionado con alteraciones en motilidad espermática y por ende en la fertilidad. Por ello, es necesario realizar más investigaciones aplicando la técnica de lectura del fondo de extendido, para correlacionar si el tipo de fondo presentado al momento de inseminación artificial tiene un impacto sobre la preñez posterior de la hembra. Con respecto a las muestras purulentas en la mayoría de los extendidos el fondo fue de tipo sucio y un número muy reducido tipo limpio en el flujo tipo purulento 1, en cambio en el tipo purulento 2 el 100% fue sucio, resultado que es de esperarse ya que presenta más del 50% de pus en su composición. Como puede observarse en los resultados, los preparados de extendidos que presentaban mayores valores de % de PMN N se asociaron con un fondo de tipo sucio. Estos resultados confirman la presencia de células de tipo inflamatorias en los fondos de extendidos de MCV desecado sin teñir. Para el diagnóstico de ES se han descrito diferentes métodos para evaluar las características del moco como: la utilización de la densidad óptica de muestras de lavado, que arrojó una Sensibilidad del 100% y Especificidad de 82,3% (utilizando punto de corte de 18% de PMN N) (Machado et al. 2012), o la implementación de tiras reactivas de orina, mediante la estimación de esterasa leucocitarias, proteínas y pH en muestras de lavados uterinos, que se asociaron con endometritis citológica y pobre performance reproductiva (Cheong et al. 2012). Denis-Robichaud y Dubuc (2015) también reportaron el uso de esterasa leucocitaria para el diagnóstico de endometritis. Además, se realizaron estudios en los cuales se determinaron valores más elevados de marcadores inflamatorios en vacas con endometritis (Adnane et al. 2018b). Brodzki et al. (2015) reportaron mayores niveles de citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-6, IL-10 y de proteínas de fase aguda (amiloidé sérico A y haptoglobina) en muestras de suero y lavados uterinos de hembras con ES al compararlas con hembras sanas. Los marcadores de inflamación son útiles para monitorear el postparto de las hembras bovinas (Adnane et al. 2018a) pero presentan como desventaja que la medición requiere del envío y remisión de muestra al laboratorio, insume

tiempo para la obtención de resultados y los kits reactivos son costosos. Además, debido a las propiedades biofísicas del MCV para realizar determinaciones bioquímicas es necesario llevar a cabo un procesamiento específico en el laboratorio del mismo (Adnane et al. 2018a), por lo cual el operario del laboratorio debe estar capacitado.

En cuanto a la utilización de la lectura del fondo de extendido como técnica diagnóstica para vacas con endometritis, la especificidad de la prueba resultó alta para vacas con ES (85%) y EC (93%), pero la sensibilidad solo tomó valores altos para vacas con EC (85%). La razón de verosimilitud o Likelihood Ratio resultó buena para endometritis clínica y regular para endometritis subclínica. Por lo cual esta técnica permitiría un correcto diagnóstico de EC, pero no de ES. Los extendidos de fondo limpio presentaron un máximo de 6% de PMN N en *cytobrush*, es decir que las hembras con endometritis subclínica que se encuentran en el límite de detección de la técnica son las que podrían prestar a confusión o interferir en la sensibilidad de la técnica. Para el diagnóstico de ES se utilizan a nivel mundial diferentes puntos de corte % PMN N según; país, autor, días postparto de toma de muestra y técnica diagnóstica, por lo cual hay una gran variabilidad de puntos de corte empleados por los distintos investigadores (5-25% PMN N en las semanas 3^a a 5^a postparto y del 5-18% PMN N de la 5^a a la 7^a postparto) (Quintela et al. 2017), por este motivo habría que evaluar que sucede con la aplicación de la técnica de lectura de fondo de extendido para el diagnóstico de ES en regiones que utilizan valores mayores al 6% como punto de corte de PMN N, ya que fue el máximo valor encontrado de PMN N en muestras de fondo limpio. Por otra parte, no se encontró relación significativa entre la turbidez y la presencia de ES en la hembra. Por lo cual, no podría relacionarse la turbidez con presencia de enfermedad uterina, esto podría deberse a una descamación mayor de lo normal de células o presencia de detritus, que no se acompaña de un porcentaje de PMN N igual o mayor al 5% en la citología endometrial.

En otro procedimiento que podría utilizarse el método de lectura de fondo de extendido podría ser en los protocolos de transferencia de embriones, ya que se recomienda el examen citológico de la mucosa uterina de las hembras donantes (Fernandez-Sanchez et al. 2014), debido a que se encontró una correlación negativa entre el % PMN N obtenidas por *cytobrush* y el porcentaje de embriones obtenidos luego del lavado y aptos para transferir (Drillich et al. 2012). Barnes et al. (2023) reportaron menor porcentaje de embriones aptos para transferir en vacas con $6 \geq$ % PMN N que en vacas con 0% de PMN N en *cytobrush*. Por lo cual el estudio de los extendidos de MCV podría aplicarse en el momento de examinación de la hembra donante y receptora ya que es rápido, fácil de hacer, no invasivo y se correlaciona con el porcentaje de neutrófilos en el útero, lo que permitiría al operador conocer cómo se encuentra el ambiente uterino y poder realizar un tratamiento o reprogramar intervenciones en el caso que el extendido presente un fondo sucio.

En cuanto a las limitaciones del estudio, este trabajo se realizó en 146 vacas lecheras por lo cual el número de animales por grupos es reducido, por ello sería interesante realizar más pruebas de lecturas de fondo de extendido

ampliando el “n”. Además, el punto de corte utilizado para el diagnóstico de ES fue 5% PMN N en *cytobrush*, de acuerdo a lo establecido para la cuenca lechera sur de Santa Fe, Argentina (Rinaudo et al. 2011) y como se mencionó anteriormente el porcentaje de PMN N de referencia varía según autor, días postparto, región y técnica diagnóstica, por lo cual debería realizarse la puesta a punto de la prueba de lectura del fondo de extendido de acuerdo a los criterios diagnósticos de cada región o sistema.

CONCLUSIONES

Las características del MCV brindan herramientas útiles para predecir la fertilidad de la hembra bovina. El estudio del fondo de extendido de MCV es una técnica rápida, fácil de realizar a campo, económica y aporta información sobre el estado del ambiente uterino de la hembra. En este trabajo se encontró asociación entre los tipos de fondo (limpio o sucio) y el estatus uterino, ya que el fondo sucio se asoció a muestras de MCV de vacas con endometritis clínica y a un mayor porcentaje de neutrófilos en muestras de citologías endometrial obtenidas por *cytobrush*. Por lo cual la lectura de MCV con fondo sucio indica un proceso de tipo inflamatorio en el útero de las hembras bovinas. La técnica de evaluación de fondo de extendidos de MCV resultó en alta especificidad (93%) y alta sensibilidad (85%) para el diagnóstico de EC. En el caso de ES arrojó alta especificidad (85%), pero baja sensibilidad (58%) para el diagnóstico, por lo cual no podría implementarse como único método diagnóstico, pero se podría complementar otras técnicas más sensibles a campo, como por ejemplo con el uso de tiras reactivas para medir pH y esterasa leucocitaria.

Agradecimientos. Caren L. Savia es miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Argentina (CONICET). Edgardo E. Guibert es miembro jubilado del del Consejo Nacional de Investigaciones Argentina (CONICET). Este trabajo fue apoyado por la Universidad Nacional de Rosario, Secretaría de Ciencia y Tecnología (código de proyecto 1VET238). Agradecemos a la Facultad de Ciencias Veterinarias UNR, (Argentina) por permitirnos tomar muestras en el establecimiento productivo lechero de la misma, así como a los productores José Martínez de la localidad de Piñero, Santa Fe, Argentina y D'Angelo Matías de la localidad de Firmat Santa Fe, Argentina.


ORCID


Savia, C.L. ✉ lucianasavia@fcv.unr.edu.ar;  <https://orcid.org/0009-0004-8524-8060>

Algañaraz, A.C. ✉ algañarazana@fcv.unr.edu.ar;  <https://orcid.org/0009-0008-1519-9442>

Roca, M.A. ✉ manuelroca@fcv.unr.edu.ar;  <https://orcid.org/0009-0000-4420-6893>

Tobin, M. ✉ tobinmarcelo@fcv.unr.edu.ar;  <https://orcid.org/0009-0007-1603-9224>

Rinaudo, A. ✉ agustinrinaudo@fcv.unr.edu.ar;  <https://orcid.org/0009-0009-1181-4847>

Guibert, E.E. ✉ edgardoguibert@gmail.com;  <https://orcid.org/0009-0005-6854-4797>

REFERENCIAS

1. Abd-ElHafeez AM, Amin AMS, Ramadan MH, Helal A. y Mohamed M. The most applicable physical properties of cervical mucus correlated. *Adv Anim Vet Sci.* 2020; 8(s2): 122-31.
2. Abusineina M. A study of the fern-like crystalline patterns of the cervical and vaginal mucus of cattle. *Vet Rec.* 1962; 74(22): 619-21.
3. Adnane M, Meade KG, O'Farrelly C. Cervico-vaginal mucus (CVM) – an accessible source of immunologically informative biomolecules. *Vet Res Commun.* 2018a; 42(4): 255-63.
4. Adnane M, Kelly P, Chapwanya A, Meade KG, O'Farrelly C. Improved detection of biomarkers in cervico-vaginal mucus (CVM) from postpartum cattle. *BMC Vet Res.* 2018b; 14(1): 1-6.
5. Barnes M, Kasimanickam R, Kasimanickam V. Effect of subclinical endometritis and flunixin meglumine administration on pregnancy in embryo recipient beef cows. *Theriogenology.* 2023; 201: 76-82.
6. Bernardi SF, Savia CL, DE Paz LJ, Rodriguez J, Marini PR. Physical properties and ionic concentration of the bovine cervical mucus at the moment of inseminating: Spontaneous estrous and induced estrous. *J Vet Sci Technol.* 2018; 09(03): 2-5.
7. Bishnoi BL, Vyas KK, Dwaraknath, PK. Note on spinnbarkeit and crystallization pattern of bovine cervical mucus during oestrus. *Indian J Anim Sci.* 1982; 52(6): 438-40.
8. Brodzki P, Kostro K, Krakowski L, Marczuk J. Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period. *Vet Res Commun.* 2015; 39(2): 143-9.
9. Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Ricci A, Caixeta LS. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology.* 2012; 77(5): 858-64.
10. Cortés ME, Cabrera D, López R, Vigil P. Importancia del moco cervical en la fisiología reproductiva bovina. *VI Congreso Internacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia: artículos in extenso, Universidad Técnica de Cotopaxi Latacunga, Ecuador.* 2016. p. 78-95.
11. Cortés ME, González F, Vigil P. Crystallization of Bovine Cervical Mucus at Oestrus: An Update. *Rev Med Vet (Bogota).* 2014; 28:103-16.
12. Denis-Robichaud J, Dubuc J. Determination of optimal diagnostic criteria for purulent vaginal discharge and cytological endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2015; 98(10): 6848-55.
13. Drillich M, Tesfaye D, Rings F, Schellander K, Heuwieser W, Hoelker M. Effects of polymorphonuclear neutrophile infiltration into the

- endometrial environment on embryonic development in superovulated cows. *Theriogenology*. 2012; 77(3): 570-8.
14. Fernandez-Sanchez FI, Barrio-Lopez M, Quintela-Arias LA, Becerra-Gonzalez JJ, Peña-Martinez AI, Martinez-Bello D, Garcia-Herradon PJ, Perez-Marín, CC. Use of endometrial cytology and metabolic profiles for selection of embryo donor cows. *Spanish J Agric Res*. 2014; 12(3): 664-71.
 15. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*. 2005; 64(9): 1879-88.
 16. Gilbert RO. Management of Reproductive Disease in Dairy Cows. *Vet Clin North Am - Food Anim Pract*. 2016; 32(2): 387-410.
 17. 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(1-2): 9-23.
 18. LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Vet J*. 2008; 176(1): 102-14.
 19. Lim HJ, Son JK, Yoon HB, Baek KS, Kim T il, Jung YS, Kwon EG. Physical Properties of Estrus Mucus in Relation to Conception Rates in Dairy Cattle. *J Anim Reprod Biotechnol*. 2014; 29(2): 157-61.
 20. Machado VS, Knauer WA, Bicalho MLS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. A novel diagnostic technique to determine uterine health of Holstein cows at 35 days postpartum. *J Dairy Sci*. 2012; 95(3): 1349-57.
 21. Modi L, Suthar B, Nakhashi H, Sharma V, Panchasara H. Physical Characteristics of Estrual Cervical Mucus and conception rate in Repeat Breeder Kankrej Cattle. *Int J Agro Vet Med Sci*. 2011; 5(4): 416.
 22. Quintela LA, Vigo M, Becerra JJ, Barrio M, Peña AI, Herradón, PG. Endometritis subclínica en ganado vacuno lechero: etiopatogenia y diagnóstico. Revisión Bibliográfica. ITEA, Información Técnica Económica Agraria: *Revista de La Asociación Interprofesional Para El Desarrollo Agrario (AIDA)*. 2017; 113(3): 250-266.
 23. Rinaudo A, Bernardi SF, Marini PR. Prevalencia de endometritis clínica y subclínica en vacas lechera en postparto en un sistema intensivo estabulado. *Rev FAVE*. 2011; 10(2): 59-66.
 24. Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J. Comparison of two methods of detecting purulent vaginal discharge in postpartum dairy cows and effect of intrauterine cephalixin on reproductive performance. *Aust Vet J*. 2009; 87(9): 369-78.
 25. Savia CL, Reátegui J, Marini PR. Relación entre características físicas y contenido iónico del moco cervical con el estado de preñez al inseminar vaquillonas a celo detectado. *Spermova*. 2016; 6(2): 153-8.
 26. Savia CL, Osorio JS, Rodríguez JV, Guibert EE, Rinaudo A. A simple and reliable refractometric method to determine the total solids concentration of the cervico-vaginal bovine mucus samples. *Heliyon*. 2021; 7(5): 1-6.
 27. Savia CL. Características físico-químicas del moco cérvico-vaginal de vacas Lecheras Holando Argentino con endometritis subclínica. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Rosario, Casilda, Argentina. 2023.
 28. 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. *Annu Rev Anim Biosci*. 2019; 7(1): 361-384.
 29. Tsiligianni TH, Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis PH. Relationship between certain physical properties of cervical mucus and fertility in cows. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 2000; 107(1): 28-31.
 30. Tsiligianni T, Karagiannidis A, Brikas P, Saratsis P. Physical properties of bovine cervical mucus during normal and induced (progesterone and/or PGF2 α) estrus. *Theriogenology*. 2001; 55(2): 629-40.
 31. Van Raemdonck GAA, Tjalma WAA, Coen EP, Depuydt CE, Van Ostade XWM. Identification of protein biomarkers for cervical cancer using human cervicovaginal fluid. *PLoS One*. 2014; 9(9): e106488.
 32. Van Schyndel SJ, Pascottini OB, Leblanc SJ. Comparison of cow-side diagnostic techniques for subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*. 2018; 120: 117-122.
 33. Villacrés Barrionuevo VM. Diagnóstico de endometritis subclínica mediante citobrush en vacas post-parto en el hato del CIPCA. BS thesis. *Universidad Estatal Amazónica, Puyo*, Ecuador. 2016.
 34. Zegels G, Van Raemdonck GAA, Tjalma WAA, Van Ostade XWM. Use of cervicovaginal fluid for the identification of biomarkers for pathologies of the female genital tract. *Proteome Sci*. 2010; 8: 1-23.