

**PUNTO DE CORTE DE POLIMORFOS NUCLEARES NEUTRÓFILOS PARA
DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA POR CITOLOGÍA
ENDOMETRIAL EN VACAS LECHERAS.**

Polymorphonuclear neutrophils cut off for subclinical endometritis diagnostic by
mean of endometrial cytology in dairy cows

Juan Reátegui^{1, 5}, Edith Arenas^{2, 5}, Fernando Fernández^{1, 5}, Agustín Rinaudo^{3, 5}, Santiago
Cuadros^{1, 5}, Pablo R. Marini^{4, 5}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.18>

- ¹ *Escuela de Postgrado.
Universidad Católica de Santa
María – Arequipa. Perú.*
- ² *Práctica Privada. Investigador
Asociado al CLEPL.*
- ³ *Cátedra de Histología II y
Embriología Especial. Facultad
de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de
Rosario (UNR)*
- ⁴ *Cátedra de Producción de
Bovinos Lecheros. Facultad de
Ciencias Veterinarias – UNR*
- ⁵ *Centro Latinoamericano de
Estudios de Problemáticas
Lecheras (CLEPL).*

E-mail: jreategu@ucsm.edu.pe

RESUMEN

El punto de corte consiste en la determinación del valor mínimo por encima del cual se puede diagnosticar a un individuo como enfermo. Se utilizaron 134 vacas primíparas y multíparas de raza Holstein Friesiam, en posparto comprendido entre 21 a 56 días de leche en diferentes establos lecheros de Arequipa con el objetivo de determinar el punto de corte del porcentaje de Neutrófilos para el diagnóstico de endometritis subclínica (ES). En cada vaca se tomó una muestra citológica de la mucosa endometrial utilizando cepillos endocervicales adaptados. Los frotis realizados sobre porta objetos limpios fueron fijados al aire, luego se remitieron a laboratorio donde se colorearon mediante la tinción Diff-Quick y se realizó la lectura de los mismos obteniéndose el porcentaje de Polimorfonucleares Neutrófilos (% PMN N), en relación a las células totales (epiteliales + neutrófilos). Para determinar el punto de corte se utilizó un análisis estadístico de Curva ROC (Características Operativas del Receptor) y se determinó que el valor de corte obtenido para %PMN N es >5,10% con una sensibilidad de 77,55 y una especificidad de 38,89. El nivel de corte de PMN N hallado para el diagnóstico de ES deberá servir de referencia de diagnóstico mediante la técnica de citología endometrial, por tal motivo las vacas de dicha zona podrán ser evaluadas en un futuro con el mencionado punto de corte del % PMN N.

Palabras clave: *polimorfonucleares, curva ROC, endometritis subclínica*

ABSTRACT

The cutoff point is the determination of the minimum value above which can diagnose an individual as sick. A total of 134 lactating Holstein Friesian dairy cows from different farms in Arequipa, were investigated. Primiparous and multiparous postpartum comprised between 21-56 days from de first milking day until the sample were taken; in order to determine where to cutoff point the percentage of neutrophils in diagnosing subclinical endometritis (SE). A cytological sample of the endometrial lining using endocervical brushes adapted was taken. Smears made on a clean slide were fixed on air, then sent to the laboratory to be stained by Diff-Quick staining and reading thereof was performed to obtain the percentage of polymorph-nuclear neutrophils (% PMNs N) in relation to the total cells (epithelial + neutrophils). A statistical analysis of ROC curve (receiver operating characteristic) was used and it was determined that the cutoff point value obtained for polymorph-nuclear neutrophils is $> 5.10\%$ with a sensitivity and specificity of 77.55 and 38.89 respectively. The cutoff level of polymorph-nuclear neutrophils found for the diagnosis of Subclinical endometritis, will be used as a reference for diagnosis by endometrial cytology technique, so such cows from that area will be evaluated in the future with the aforementioned cutoff point.

Keywords: *polymorph-nuclear, ROC curve, subclinical endometritis*

INTRODUCCION

La capacidad reproductiva de las vacas lecheras está siendo amenazada por diferentes factores principalmente nutricionales, genéticos, sanitarios y de manejo. Las pérdidas reproductivas incluyen un incremento del número de días de vacía, aumento de los servicios por concepción y un incremento del riesgo de rechazo debido a fallas reproductivas (LeBlanc *et al.*, 2002).

La endometritis subclínica se define como una inflamación del endometrio en ausencia de signos clínicos de endometritis (Sheldon *et al.*, 2006). Las enfermedades uterinas postparto comprometen severamente la eficiencia reproductiva. Palmer (2008) indica que la endometritis es la inflamación del endometrio usualmente debido a la persistencia de una infección moderada o al retraso en la involución uterina. Los signos de endometritis subclínica son la presencia de Polimorfos Nucleares Neutrófilos en el lumen uterino sin descargas purulentas (Sheldon, 2006).

El diagnóstico de endometritis subclínica en vacas lecheras se basa fundamentalmente en el cálculo del porcentaje de Polimorfo Nucleares Neutrófilos (%PMN - N) presentes en los frotis obtenidos por medio de la técnica citológica de cepillado de la mucosa endometrial o Cytobrush.

El punto de corte de una prueba diagnóstica consiste en la determinación del valor mínimo por encima del cual se puede diagnosticar a un individuo como enfermo. Para lograr determinar el mencionado punto de corte se utiliza un análisis estadístico denominado Curva ROC (Características Operativas del Receptor), el cual consiste en la determinación del valor de diagnóstico con la mayor sensibilidad (probabilidad que para un individuo realmente enfermo el resultado sea positivo) y especificidad (probabilidad que para un individuo realmente sano el resultado sea negativo).

Lo indicado, son razones suficientes para plantearnos como objetivo del presente trabajo, determinar el punto de corte de Polimorfonucleares Neutrófilos (PMN N) para el diagnóstico de Endometritis Subclínica en vacas de hatos lecheros de la región de Arequipa.

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron 134 vacas lecheras de raza Holstein Friesiam, en el período posparto comprendido entre 21 a 56 DEL; de establos lecheros de la Irrigación de Majes ($16^{\circ} 20' 08,35''$ Latitud Sur y $72^{\circ} 09' 09,56''$ Longitud Oeste). Todas las vacas se manejaron con similares condiciones y todas las vacas al momento del estudio se encontraban clínicamente sanas.

Se tomaron muestras citológicas del endometrio de cada vaca por la técnica de cytobrush, nombre que reciben los cepillos endocervicales, que fueron cortados aproximadamente a cinco cm de largo y enroscados en el extremo del mandril de una pistola universal de IA de acero inoxidable diseñada para este trabajo. Para proteger la pistola de la contaminación vaginal, la misma fue cubierta con una funda descartable. La región perineal y la vulva fueron higienizadas con solución yodada y toallas de papel absorbente. La pistola de inseminación se introdujo, guiada manualmente por la palpación rectal, a través de la vulva, vestibulo vaginal y vagina pasando a través del cérvix y se colocó en el cuerpo uterino o en la base del cuerno de mayor tamaño en los casos de asimetría, donde el cepillo se expuso de la funda y se procedió a la realización de la toma de muestra dando un giro al mismo en sentido de las agujas del reloj sobre la mucosa uterina. El cepillo luego se retrajo dentro de la funda y la pistola de inseminación fue retirada del útero y vagina. Posteriormente, se realizaron frotis rotando cada cepillo con la muestra sobre un portaobjetos limpio, y se determinó el

porcentaje de Polimorfonucleares Neutrófilos para constatar la existencia de ES. Cada frotis fue realizado sobre un portaobjetos, rotulado con el número de arete correspondiente al animal y la fecha de toma de la muestras. Inmediatamente de realizado el extendido fue fijado y almacenado en cajas transportadoras de 50 portaobjetos. Una vez fijadas se remitieron al laboratorio donde se realizó una tinción Diff Quick. Para cada frotis se contaron un mínimo de 100 (cien) células totales (células epiteliales y células inflamatorias), a partir de las cuales se determinó un porcentaje de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, neutrófilos) de las cuales los neutrófilos fueron los utilizados para determinar el grado de inflamación de la mucosa uterina (Reátegui *et al.*, 2014).

El diagnóstico de endometritis subclínica en vacas lecheras se basa fundamentalmente en el cálculo del porcentaje de Polimorfo Nucleares Neutrófilos (%PMN - N) presentes en los frotis obtenidos por medio de la técnica citológica de cepillado de la mucosa uterina o Cytobrush. El punto de corte de una prueba diagnóstica consiste en la determinación del valor mínimo por encima del cual se puede diagnosticar a un individuo como enfermo. Para lograr determinar el mencionado punto de corte se utiliza un análisis estadístico denominado Curva ROC (Características Operativas del Receptor), el cual consiste en la determinación del valor de diagnóstico con la mayor sensibilidad (probabilidad que para un individuo realmente enfermo el resultado sea positivo) y especificidad (probabilidad que para un individuo realmente sano el resultado sea negativo) (Rinaudo *et al.*, 2012)

Las variables evaluadas fueron: días en leche (DEL), Intervalo Parto Concepción (IPC) y valor de corte de porcentaje PMN - N.

RESULTADOS

Los resultados se pueden observar en la Figura 1, para la clasificación de la variable de Intervalo Parto Concepción (IPC) de 120 días y un tamaño de muestra de 134 animales, se determinó, a través del análisis estadístico Curva ROC, un punto de corte de >5,10% con una sensibilidad de 77,55 y una especificidad de 38,89.

El valor de corte obtenido para PMN N de 5,10% se encuentra cercano al 5,00% de PMN N recomendado por la publicaciones de Gilber *et al.* (2005) para Estados Unidos de América y Plöntzke *et al.* (2010). Asimismo el porcentaje obtenido es similar al reportado en investigaciones de endometritis subclínica manifestado por Madoz (2012) quien reporto un 5% de PMN N en 21 – 62 DEL. El valor es menor a los reportados en investigaciones de

Argentina de endometritis subclínica manifestado por Rinaudo *et al.*, (2012) quienes obtuvieron valores de PMN N de 6.18% con una sensibilidad del 72.0% y una especificidad del 88.0%.

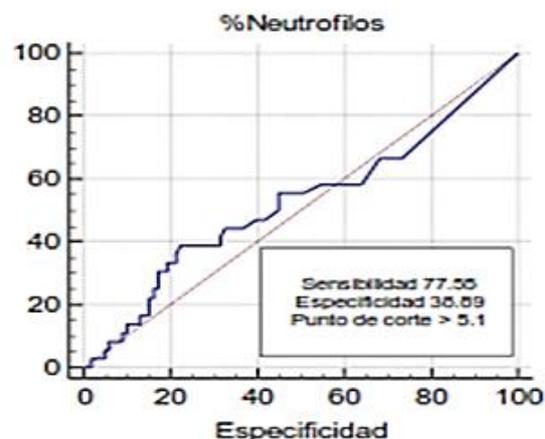


Figura 1. Curva ROC para determinar el punto de corte de % PMN N y determinación de positivos en muestras de citología endometrial

DISCUSIONES

Los valores de corte reportados en los diferentes trabajos de investigación demuestran que en vacas normales el porcentaje de PMN - N no debería superar el 5%, ya que a partir de este umbral comenzaría a disminuir la eficiencia reproductiva de vacas lecheras, aumentando el Intervalo Parto Concepción (IPC). Gran parte de las publicaciones internacionales, se podría considerar que en ausencia de Endometritis Clínica (EC) una vaca es diagnosticada positiva a ES cuando la citología endometrial presenta >18% PMN - N para muestras tomadas entre los 21 - 33 DEL, o >10% PMN para muestras entre 34 - 47 DEL; (Kasimanickam *et al.*, 2004; Sheldon *et al.*, 2006). A pesar de que estos valores de corte son los aceptados por la mayoría de los investigadores, no existe consenso total, variando los valores de corte entre 4 y 25% PMN - N (Galvão *et al.*, 2009; Hammon *et al.*, 2006); basadas en estas diferencias, las interpretaciones y comparación de resultados entre diferentes estudios se hace controversial.

CONCLUSIÓN

El punto de corte >5,10% PMN N obtenido para este grupo de vacas lecheras de hatos de la región de Arequipa, es similar al 5% PMN N utilizado por diversos autores (Gilber *et al.*, 2005; Plöntzke *et al.*, 2010; Rinaudo *et al.*, 2012), por tal motivo las vacas de dicha zona podrán ser evaluadas en un futuro con el mencionado valor de %PMN N.

REFERENCIAS

- Cheong SH, Nydam DV, Galvão KN, Crosier BM, Gilbert RO. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2011; 94:762–770.
- 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: 1879–1888.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2004; 62:9–23
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002; 85, 2223 - 2236.
- Plöntzke J, Madoz LV, de la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W. Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Animal Reproduction Science.* 2010; 122(1-2):527.
- Reátegui J, Marini A, Fernández F, Rinaudo A, Cuadros S, Marini P. Endometritis subclínica en el postparto de vacas lecheras en sistemas intensivos de producción de leche, Arequipa. *SPERMOVA* 2014; 4(1): 74 -76
- Rinaudo A, Bernardi S, Marini P. Punto de corte del porcentaje de neutrófilos para el diagnóstico de endometritis subclínica en vacas lecheras. XII Jornadas de Divulgación Técnico - Científica Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de Rosario. Págs. 279 – 280.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006; 65, 1516-1530.