

**RIPRODUZIONE BOVINA**

# La citologia nella diagnosi di endometrite subclinica

Giovanni Gnemmi, Elisa Ferrari, Cristina Maraboli  
 Medici veterinari liberi professionisti, Bovinevet - Bovine Ultrasound Services  
 Premosello Chiovena (VB)

**RIASSUNTO**

L'endometrite sub-clinica è un'infezione uterina, che per le sue negative conseguenze sulla fertilità della bovina, non deve essere sottovalutata anche se il problema va ridimensionato sul piano epidemiologico. Anche l'accuratezza della citologia uterina va riconsiderata. Essa rimane comunque un ottimo test, se realizzato in 4-5 settimane *post partum* su un gruppo di animali, contemporanei per data di parto, per predire la fertilità del gruppo.

**Parole chiave:** riproduzione, endometrite subclinica, diagnosi, citologia, bovina da latte.

**SUMMARY**

**Cytology in the diagnosis of subclinical endometritis**

Subclinical endometritis is an inflammation of the uterus, which due to its negative impact on fertility, should not be underestimated even though the problem should be epidemiologically reconsidered. Also the accuracy of the uterine cytology should be reconsidered. It is still a good test, carried out at 4-5 weeks 0 in a group of animals, contemporary to the date of delivery, to predict the fertility of the group.

**Keywords:** reproduction, subclinical endometritis, diagnosis, cytology, dairy cow.

**N**egli ultimi dieci anni, si è molto parlato di endometrite sub-clinica: secondo i dati bibliografici, il 20-50% delle bovine da latte soffrirebbe di questa patologia a ridosso della fine del tempo di attesa volontario. L'endometrite sub-clinica è considerata responsabile di un basso tasso di concepimento e di un elevato tasso di morte embrionale tardiva (28-56 giorni), inoltre è spesso associata alla sindrome *repeat breeders*. A torto o a ragione, questa infiammazione uterina è considerata uno dei problemi emergenti della gestione riproduttiva del bovino da latte. Gli autori analizzano l'applicabilità in campo del *cytobrush*, esame che è stato indicato come il gold standard nella diagnosi di endometrite sub-clinica (foto 1).

## Definizione delle infezioni-infiammazioni dell'utero

Nel bovino si distinguono diverse forme d'infezione-infiammazione dell'utero, nei primi 50 giorni di lattazione. Si parla di metrite, per indicare infezioni-infiammazioni uterine, del miometrio e dell'endometrio nei primi 20 giorni *post partum* (Sheldon *et al.* 2006), mentre si parla di endometrite per indicare delle infiammazioni uterine dell'endometrio che si sviluppano dopo il 20° giorno *post partum* (Sheldon *et al.* 2006). Recentemente questa classificazione, in vigore dal 2006 (Sheldon *et al.* 2006), è stata messa in discussione (Goshen *et al.* 2013): le metriti che a loro volta sono divise in tre gradi (metrite clinica o I°, metrite puerperale o II°, metrite settica o III°) e indicate come una infezione-infiammazione del miometrio e dell'endometrio, dovrebbero essere ri-definite: secondo la scuola israeliana, nel puerperio, non ci sarebbe mai una infiammazione del mio-

metrio, ma del solo endometrio; per questo motivo è corretto parlare di endometrite puerperale, invece di metrite puerperale (Goshen *et al.* 2013).

Le endometriti, a loro volta sono distinte in cliniche e sub-cliniche. Le prime si dividono a loro volta in purulente, per un contenuto uterino > 50% di PMN e muco-purulente per un contenuto in PMN ≤ 50%. Le endometriti purulente si sviluppano normalmente tra il 21°-25° giorno, mentre le endometriti muco-purulente, dopo questo periodo (Sheldon *et al.* 2006). Le endometriti cliniche sono delle infiammazioni croniche dell'endometrio a partire del 21° giorno *post partum* (Gilbert *et al.* 1998, LeBlanc *et al.* 2002, Kasimanickam *et al.* 2004, Sheldon *et al.* 2006, Kasimanickam *et al.* 2006, Dunoc *et al.* 2010), caratterizzate dalla presenza di perdite vaginali di materiale purulento o muco-purulento, o per la presenza dello stesso materiale nella parte craniale della vagina, senza che vi siano pe-

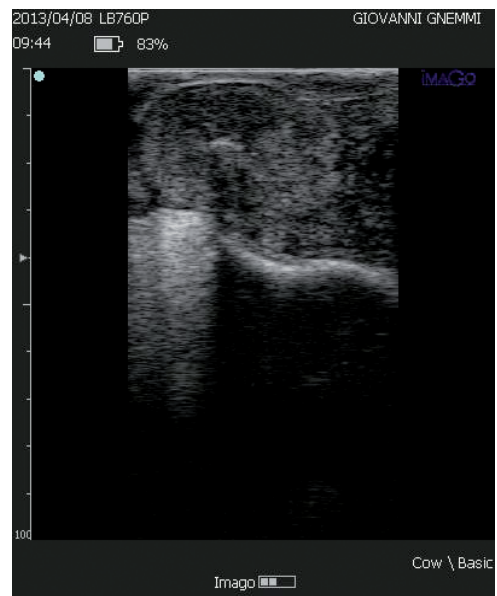


Foto 1. Endometrite subclinica.

raltro sintomi clinici generali. Questa definizione è valida per definire in generale il problema delle endometriti, ma certamente non è perfetta; non sempre, infatti, la presenza di perdite vaginali e/o di materiale purulento o muco-purulento in vagina, può essere correlata a un'infezione uterina (Gnemmi *et al.* 2013). Infiammazioni della cervice e del vestibolo vaginale (vaginiti e ascessi del vestibolo che fistolizzano), producono perdite purulente e muco-purulente, senza peraltro che vi sia nessun coinvolgimento dell'endometrio uterino (Gnemmi *et al.* 2013).

Analogamente in presenza di una cistite o di una pielonefrite, è possibile incontrare perdite vaginali o nel vestibolo (Gnemmi *et al.* 2013).

L'endometrite subclinica è una infiammazione cronica dell'endometrio (Gilbert *et al.* 1998, Kasimanickam *et al.* 2004, Gilbert *et al.* 2005, Sheldon *et al.* 2006, Kasimanickam *et al.* 2006, Baransky *et al.* 2012), in assenza di perdite vaginali o di materiale purulento o muco-purulento, nella parte craniale della vagina, normalmente diagnosticata attraverso esame citologico. L'endometrite subclinica è caratterizzata dalla presenza di > 18% di PMN nella citologia uterina realizzata tra il 20°-33° giorno *post partum* o da > 10% di PMN nella citologia uterina realizzata tra il 34°-47° giorno *post partum* (Sheldon *et al.* 2006). Per questo è anche definita, a torto, "endometrite citologica".

### 1. Incidenza dell'endometrite subclinica

L'endometrite subclinica è considerata, a torto o a ragione, una delle patologie emergenti nella gestione riproduttiva del bovino da latte. Il 20-50% delle bovine da latte soffrirebbe infatti di questa patologia (Gilbert *et al.* 2005; Sheldon *et al.* 2009; Duboc *et al.* 2010, Cheong *et al.* 2011). Questa incidenza è il risultato del tipo di metodo impiegato per la diagnosi.

### 2. Diagnosi di endometrite subclinica

La diagnosi di endometrite può essere realizzata in diversi modi. Certamente la diagnosi manuale non è affidabile, presentando un margine di errore altissimo (Miller *et al.* 1995; Gnemmi *et al.* 2013a, Gnemmi *et al.* 2013b). La diagnosi con la mano in vagina non è accurata (Sheldon *et al.* 2002), così come l'esame con lo speculum (Miller *et al.* 1980; De Kruif *et al.*

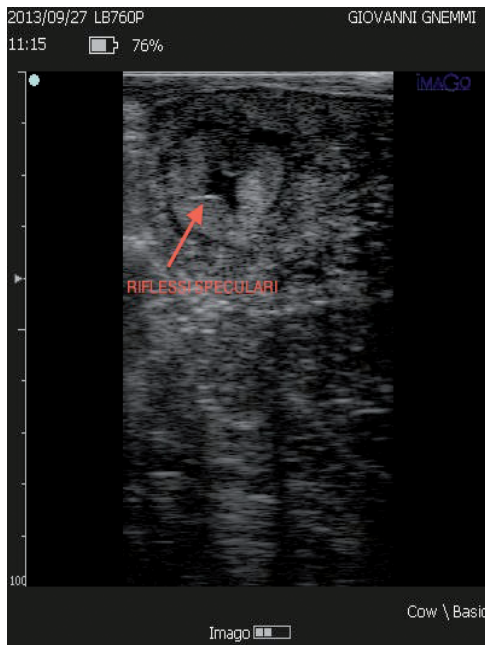
1982), o con il metricheck (Riddle 2004, McDougall *et al.* 2007). La diagnosi ultrasonografica viene ritenuta, a torto (Gnemmi *et al.* 2013; Gnemmi *et al.* 2013b), poco accurata.

Si contesta soprattutto la bassa sensibilità del metodo, in altre parole l'eccessivo numero di falsi positivi; questa considerazione è condivisibile, basandosi fino a oggi la diagnosi, semplicemente sullo spessore dell'endometrio (> 8 mm) e sul diametro del lume uterino (> 3mm) (Barlund *et al.* 2008). Sulla base di questi due parametri, tutte le vacche che si trovino nella fase estrogenica del ciclo (pro-estro, estro, meta-estro), risultano soddisfare questi due parametri e quindi rientrerebbero tra le bovine con endometrite subclinica. Gli autori contestano questo approccio, proponendo altri segni per effettuare la diagnosi di endometrite subclinica, quali la valutazione ecografica del tipo di contenuto uterino, della mappa follicolare e soprattutto la presenza del tipo di artefatti: *shadows* (coni di ombra), o riflessi speculari (Gnemmi *et al.* 2013a; Gnemmi *et al.* 2013b; Gnemmi *et al.* 2013c; Gnemmi *et al.* 2013d). È necessario dimostrare statisticamente la qualità di questi parametri per la diagnosi di endometrite subclinica (foto 2 e 3).

Fino ad oggi, la diagnosi di endometrite sub-clinica è stata realizzata attraverso



**Foto 2.** Endometrite subclinica e artefatti. La presenza di *shadows* (coni d'ombra) è sempre indicativa della presenza di materiale purulento, molto disidratato, all'interno dell'utero.



**Foto 3.** Endometrite subclinica e artefatti. La presenza di riflessi speculari all'interno dell'utero è sempre indicativa di un profilo estrogenico.

la determinazione della citologia uterina, con un cyto-brush (Barlund et al. 2008), oppure con un *cyto-flushing* (Gilbert et al. 2005).

Questo esame è stato ritenuto, fino a oggi, il gold standard. Una “convincione” attualmente messa in discussione (Foley et al. 2013): spesso le bovine affette da endometrite presentano un valore di PMN alla fine del tempo di attesa volontario < 6-8%, mentre è possibile trovare bovine a 40-50 giorni *post partum*, senza endometrite e con valori di PMN > 6-8% (Foley et al. 2013). Sulla base di queste nuove osservazioni, il ruolo della citologia uterina va rivisto: i neutrofili sarebbero dei marker cellulari che permettono di stabilire una “tendenza” (Quintela et al. 2012), ma non in grado di emettere una diagnosi individuale certa di endometrite sub-clinica. I linfociti, sono marker più accurati allo scopo, ma non sono posizionati superficialmente come i neutrofili, per questo è necessaria una biopsia per la loro individuazione (Bonnet et al. 1993; Chapwanya et al. 2010; Buczkowska et al. 2013; Taponen 2013). Questo esame è poco praticabile in condizioni di campo, ma soprattutto vi sono pareri contrastanti rispetto al prognostico riproduttivo degli animali sottoposti alla biopsia (Ahmadi et al. 2005; Sheldon et al. 2006; Bollowein et al. 2013, comunicazione personale).

Recentemente sono stati proposti anche degli strip test per la diagnosi di endometrite, basati sulla determinazione della *leukocyte esterase* (Cheong et al. 2012; Couto et al., 2013); l'accuratezza di questi test è oggi molto bassa.

## Citologia uterina

### 1. La tecnica

La diagnosi di endometrite subclinica, basata sulla determinazione dei PMN, si basa su un concetto molto semplice: un processo infiammatorio dell'utero causa sempre una migrazione di PMN (Klucinsky et al. 1990), che sono la prima linea di difesa, nei confronti dell'agente infettivo. La diagnosi citologica dell'utero può essere realizzata con due tecniche distinte: *cytobrush* (Barlund et al. 2008) e *cyto-flushing* (Gilbert et al. 2005). Il *cyto-flushing* è un esame semplice: sono necessari 20-25 ml di soluzione fisiologica sterile o di PBS, un catetere rigido o morbido (silicone) con relativo mandrino, una camicia sanitaria (morbida o rigida) e una siringa da 30 cc. Se si utilizza un catetere di silicone da *embryo transfer*, è necessaria anche una siringa da 20 ml per gonfiare il palloncino del catetere, che ne permette il bloccaggio nell'utero.

L'uso del catetere morbido, richiede più tempo, ma permette di avere un numero d'insuccessi inferiore. Infatti, realizzan-



**Foto 4.** Device per la realizzazione del cytobrush. Apparato pre-confezionato, per la realizzazione del cytobrush, costituito da un mandrino e da una camicia sanitaria rigida e lunga.



Foto 5. Particolare del *cytobrush*.

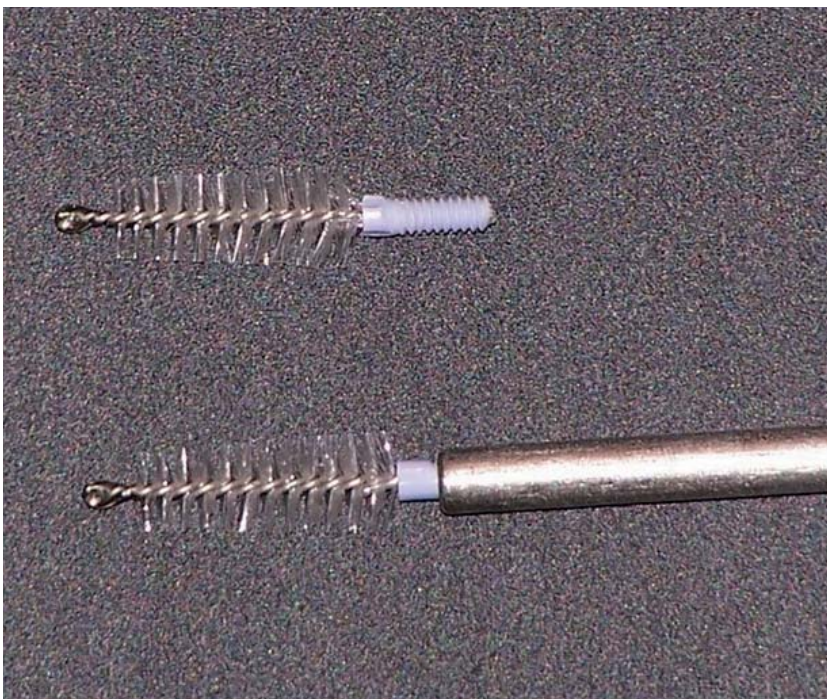


Foto 6. *Cytobrush* artigianale (foto Mark Drillich).

do il recupero cellulare per questa via, uno dei rischi, soprattutto ricorrendo a un catetere rigido, è proprio quello di non riuscire a prelevare il liquido di lavaggio, una volta introdotto nell'utero.

Con questa tecnica, si determina anche un maggiore danno cellulare e l'esame nel complesso richiede parecchio più tempo, dovendo anche centrifugare (2.300 rpm x 15 minuti) il liquido di lavaggio.

L'equipaggiamento può essere molto semplificato, ricorrendo a guaina da ET (non micronizzata, trasparente), a una pistolalet da ET, una siringa da 30 cc, una camicia sanitari (morbida o rigida). La guaina è caricata sulla pistolalet, quindi posta in una camicia sanitaria; superata la seconda plica cervicale, si esce dalla camicia sanitaria e si prende la via nel corno uterino. Superata la grande curvatura, si estrae la pistolalet, mantenendo la guaina all'interno dell'utero, bloccata per via trans-rettale con le dita. Si collega la siringa alla guaina e s'inietta la soluzione fisiologica o il PBS e aspirando dopo un morbido massaggio del liquido nell'utero.

Assai più rapido è il *cytobrush*. Per questo esame si possono utilizzare dei sistemi già confezionati (MiniTube 2012), oppure si possono utilizzare dei sistemi artigianali (foto 4 e 5). I device pre-confezionati oggi disponibili, sono un adattamento di quelli in uso, da tempo, nella cavalla.

Hanno un costo di circa 3,5 € l'uno con un diametro esterno di 4-5 mm, ottima misura se non fosse per la struttura troppo flessibile dell'impianto, che rende la penetrazione della cervice particolarmente difficile, fin anche impossibile, nelle bovine di primo parto. I sistemi artigianali sono molto semplici e costano solo pochi centesimi di euro. Occorre essere certi della saldatura del *cytobrush* al mandrino, onde evitare di perderlo all'interno dell'utero, situazione sempre molto imbarazzante (foto 6 e 7).

Una volta che il dispositivo (artigianale o pre-confezionato) è all'interno dell'utero, si prende la via di un corno uterino e, normalmente nel terzo anteriore del corno uterino, si estrae lo spazzolino dalla protezione e si realizza una strisciata sulla superficie dell'utero.

Il dispositivo viene estratto dall'utero e immediatamente si striscia sul vetrino. Il vetrino è lasciato all'aria 15-20 secondi per asciugare e quindi ritirato in apposito contenitore. È possibile ricorrere al *cytospray*, per fissare la strisciata sul vetrino, ma non è indispensabile (foto 8). Dopo aver strisciato lo spazzolino sul vetrino, si lascia essiccare per una ventina di secondi all'aria, quindi va riposto, eventualmente dopo averlo fissato con il *cytospray*).

I vetrini possono essere colorati con Dip Quick® (colorazione in tre passaggi) e quindi visionati al microscopio (foto 9). I PMN sono facilmente riconoscibili mi-

crossopicamente: sono cellule più piccole di quelle dell'epitelio endometriale, inoltre hanno una forma bilobata del nucleo (Ahmadi *et al.*, 2005; Quintela *et al.* 2010). Calcolando la percentuale di PMN, sul totale delle cellule presenti, è "possibile" evidenziare o meno la presenza di un'endometrite.

Si calcola il numero di PMN, secondo due differenti metodi: calcolando il numero di PMN ogni 150 cellule, in 10 campi a 1000 x; oppure si può calcolare la percentuale di PMN su un minimo di 100 cellule, su 10 campi a 400 x (Barlund *et al.* 2008, Quintela *et al.* 2010).

## 2. Interpretazione dei dati

Il cut off utilizzato per definire un'infiammazione uterina endometrite subclinica, cambia in ragione dell'autore e della distanza dal parto (tabella 1).

Una bovina che alla fine del tempo di attesa volontario ha una percentuale di neutrofili superiore al 4-6%, si deve ritenere, secondo questa classificazione, affetta da un'endometrite subclinica (Barlund *et al.* 2008). Analizzando la bibliografia internazionale, il 20-50% delle bovine soffrirebbe di endometrite subclinica (Gilbert *et al.* 2005; Duboc *et al.* 2010; Cheong *et al.* 2011), un dato sicuramente inquietante, che soprattutto deve far riflettere sull'accuratezza del metodo diagnostico utilizzato.

Se la valutazione dei neutrofili, può sicuramente essere giudicata con riserva, quale metodo diagnostico per la valutazione individuale di endometrite subclinica, la valutazione del contenuto in neutrofili su di un gruppo di animali contemporanei per parto (30-35 giorni *post partum*), è un ottimo indicatore della futura fertilità del gruppo, utilizzando un cut off del 18% (Quintela *et al.* 2012): gli animali che hanno un contenuto di PMN maggiore al 18% avranno, tendenzialmente, più problemi ad ingravidarsi degli animali con un contenuto in neutrofili minore al 18%.

## Conclusioni

L'endometrite sub-clinica è un'infiammazione uterina, che per le sue negative conseguenze sulla fertilità della bovina, non deve essere sottovalutata. Tuttavia, secondo gli autori, il problema va ridimensionato sul piano epidemiologico: il numero di animali che soffrono di questa infiammazione cronica dell'utero è notevolmente inferiore a quanto pro-

Tabella 1. Cut off proposti in ragione della distanza dal parto

| Autore                     | Cutoff         | Giorni dal parto | Anno |
|----------------------------|----------------|------------------|------|
| Kasimanickam <i>et al.</i> | > 18%<br>> 10% | 20-33            | 2004 |
| Gilbert <i>et al.</i>      | > 5            | 40-60            | 2005 |
| Hammon <i>et al.</i>       | > 25           | 28 ± 3           | 2006 |
| Barlund <i>et al.</i>      | > 8            | 28-41            | 2008 |
| Galvao <i>et al.</i>       | ≥ 4            | 49               | 2009 |
| Kaufman <i>et al.</i>      | > 15           | 4 ore dopo la IA | 2009 |
| Salasel <i>et al.</i>      | ≥ 3            | 190 ± 40         | 2010 |
| Couto <i>et al.</i>        | 6-7            | 32-47            | 2013 |

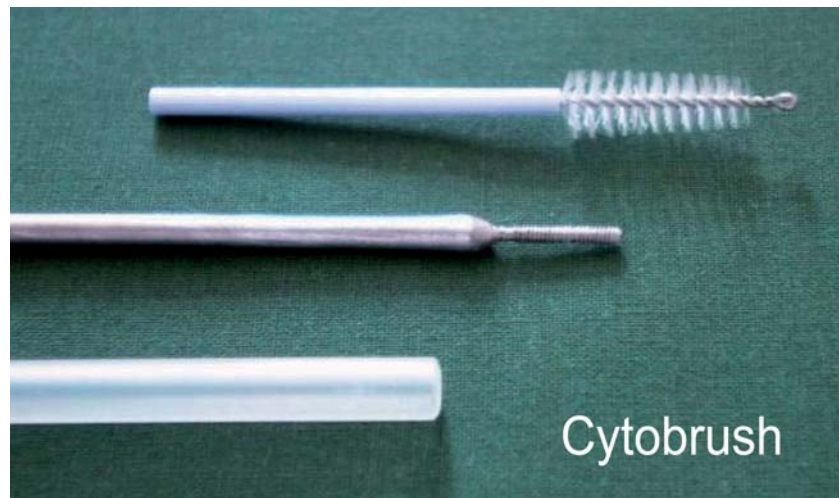


Foto 7. Cytobrush artigianale (foto Colin Palmer).



Foto 8. Cytospray.



**Foto 8.** Colorazione Dip Quick®. Colorazione rapida in tre passaggi, lasciando circa un minuto il vetrino in ogni bagno.

spettato, sia negli animali alla fine del tempo di attesa volontario, che nelle bo-

vine *repeat breeders*.

L'incidenza di endometrite subclinica va sicuramente rivista al ribasso, soprattutto va riconsiderata l'accuratezza della citologia uterina, fino a ieri ritenuta, erroneamente, il gold standard.

Le variabili individuali sono molte, la presenza di molti falsi positivi e di molti falsi negativi dopo esame citologico devono far riflettere sull'accuratezza del metodo per una diagnosi individuale. La tecnica è invece un ottimo test, se realizzato in 4-5 settimana *post partum* su un gruppo di animali, contemporanei per data di parto, per predire la fertilità del gruppo.

I costi, diretti e indiretti della tecnica, non la rendono interessante per un uso sistematico e quotidiano, sull'intera mandria. Inoltre non va dimenticato l'aspetto economico: la diagnosi citologica, non dà una risposta in tempo reale, e richiede oltre al tempo, un maggior contributo in termini di aiuto, per poter essere correttamente realizzata (Gnemmi *et al.* 2013). ■