

Modalità operative

Chi sono i destinatari del corso FAD?

Il corso, accreditato presso la Conferenza Nazionale per la Formazione Continua, è rivolto alla categoria dei medici veterinari.

È importante essere abbonati a *SUMMA Animali da reddito* per accedere al corso FAD?

Per gli abbonati a *SUMMA Animali da reddito* sono previste condizioni riservate e particolarmente vantaggiose.

Come si svolge il corso?

Il corso è composto da 9 dossier (materiale formativo) pubblicati in successione su *SUMMA Animali da reddito* a partire da gennaio/febbraio 2015 (SUMMA n. 1) e fino a dicembre 2015 (SUMMA n. 10). Soltanto il numero monote-matico in uscita a maggio 2015 (SUMMA n. 4) NON conterrà alcun dossier riferito al corso FAD.

Come si ottengono i crediti ECM?

Per ottenere i crediti ECM è necessario seguire questi semplici passaggi:

Lettura dei Dossier

I dossier pubblicati in successione sui numeri di *SUMMA Animali da reddito* durante l'anno 2015 rappresentano il materiale formativo e di studio. Si presentano come articoli scientifici, contraddistinti sulla pagina da uno specifico richiamo al corso FAD.

Sono consultabili anche in formato digitale, accedendo alla versione on line del periodico su www.pointvet.it.

Registrazione/Login su www.pviformazione.it

L'utente deve attivare un account all'indirizzo <http://fad.pviformazione.it/accedi>. L'operazione è gratuita e senza obbligo di acquisto. Naturalmente chi avesse già un account su questa piattaforma NON deve crearne uno nuovo, ma può utilizzare quello esistente.

Acquisto del questionario

Gli abbonati a *SUMMA Animali da reddito* possono acqui-

stare dall'account personale il SOLO questionario di valutazione dell'apprendimento al prezzo riservato di **€ 36,00 (IVA inclusa)**.

Attestato ECM

Superato il questionario di valutazione dell'apprendimento e compilato il questionario di valutazione della qualità percepita, è possibile dal proprio account effettuare il download dell'attestato con i crediti ECM.

A seconda della data di superamento del questionario, i crediti saranno attribuiti all'anno 2015 (corso concluso entro il 31.12.15) o all'anno 2016 (corso concluso dopo il 31.12.15).

Come è composto il questionario?

Il questionario verte sui temi trattati dai singoli dossier pubblicati su *SUMMA Animali da reddito* ed è disponibile soltanto on line.

Si compone di **9 test** in successione, attivati in contemporanea con l'uscita del dossier a cui si riferiscono. L'ultimo test pubblicato sarà pertanto quello riferito al dossier di *SUMMA Animali da reddito n. 10*, dicembre 2015.

Ogni test presenta una serie di domande a risposta quadrupla e scelta singola. Per superare il singolo test è necessario rispondere correttamente almeno all'80% delle domande.

Per informazioni dettagliate sul funzionamento dei test, si rimanda alle modalità operative FAD sul sito www.pviformazione.it.

Il questionario di valutazione dell'apprendimento si considera concluso una volta superati tutti e 9 i singoli test. Per accedere al download dell'attestato ECM sarà sufficiente a questo punto compilare il form di valutazione della qualità percepita.

Quando termina il corso?

La validità del corso abbinato a *SUMMA Animali da reddito* termina in data 14 febbraio 2016. Dopo la scadenza NON sarà più possibile ottenere i relativi crediti ECM.

PATOLOGIE DELLA RIPRODUZIONE

Endometritie subclinica

QUESTO DOSSIER
PREVEDE MATERIALE
ACCESSORIO*

Giovanni Gemmi, Elisa Ferrari, Cristina Maraboli

Medici veterinari liberi professionisti Bovinevet – Bovine Ultrasound Services Premosello Chiovena (VB).

RIASSUNTO

Patologia controversa, di cui, da qualche anno, si sta parlando moltissimo. È ritenuta, a torto o a ragione, uno dei principali responsabili dell'infertilità bovina, soprattutto nell'allevamento del bovino da latte a elevata produzione.

Cosa c'è di vero? Come si sviluppa questa patologia? Come è possibile fare una diagnosi? È realmente la protagonista delle basse performance riproduttive? Quanto incide direttamente e/o indirettamente sul bilancio riproduttivo?

Queste sono alcune delle domande che ogni giorno, veterinari e allevatori si pongono affrontando questa patologia uterina. Gli autori cercano di fare ordine tra le tante ipotesi che si sono fatte e che si fanno, sull'endometrite subclinica del bovino.

Parole chiave: endometrite, eziopatogenesi, diagnosi, riproduzione, vacca da latte.

SUMMARY

Subclinical endometritis

A controversial pathology, around which, lately, there has been a lot of discussion. It is considered, rightly or wrongly, one of the main causes of bovine infertility, especially in high production dairy cattle.

What is it? How this disease develops? How is it possible to make a diagnosis? It is really the main cause of low reproductive performance? How much does it affect directly and/or indirectly on reproductive budget? These are some of the questions that every day, veterinarians and breeders are confronted with when facing this uterine pathology. The authors try to clarify the many assumptions that have been made and are presently made, on subclinical bovine endometritis.

Keywords: endometritis, aetiology, diagnosis, reproduction, dairy cow.

Le patologie dell'utero rivestono un ruolo molto importante quali causa di scarsa efficienza riproduttiva nel bovino specialmente da latte. Le bovine dopo il parto sono sottoposte a un'enorme pressione metabolica: nei 30-40 giorni che seguono il parto queste bovine devono raggiungere il picco di lattazione devono riprendere a ciclare; in più si deve realizzare l'involutione uterina e la rigenerazione dell'endometrio... tutto in 30-40 giorni. Durante queste prime 4-6 settimane di lattazione le bovine soffrono di una condizione di stress metabolico che giustifica la perdita di peso e la realizzazione di un bilancio energetico negativo con influenze negative tanto sulla ciclicità che sull'involutione uterina.

La gestione riproduttiva nell'allevamento del bovino ha come obiettivo primario l'ingravidamento del più alto numero di animali dopo il parto nel più breve tempo possibile. Tale obiettivo è possibile solo se nella mandria l'incidenza delle patologie uterine è bassa o molto-bassa e se si applicano strategie convenienti ed efficaci per identificare con rapidità quelle bovine che si trovano in una situazione a rischio per la fertilità.

Le problematiche riproduttive rappresentano la prima causa di eliminazione involontaria nell'allevamento del bovino da latte e l'infertilità è sicuramente la principale causa di eliminazione per problemi riproduttivi. La possibilità di diagnosticare tempestivamente e con estrema precisione le bovine con infiammazioni e/o infezioni uterine, pertanto, ha un impatto economico e sanitario molto importante.

In questi anni, si è molto parlato dell'endometrite subclinica come una delle cause principali di perdite economiche nell'allevamento del bovino da latte; certamente l'impatto negativo di questa patologia è elevato, ma si deve chiarire l'effettivo "peso specifico" di questa controversa infermità.

Definizione

I processi infettivi/infiammatori dell'utero *post partum* comprendono la metrite e l'endometrite. La metrite è un'infezione dell'u-

tero (miometrio ed endometrio), tipica dei primi 20 giorni *post partum*. Recentemente, è stata contestata la possibilità di un coinvolgimento del miometrio nel processo infiammatorio/infettivo dell'utero *post partum*: secondo questa nuova teoria si dovrebbe parlare di endometrite puerperale, in quanto il miometrio non viene quasi mai coinvolto.

La metrite è distinta in metrite di grado I, II e III. La metrite di grado I è la metrite clinica tipica del 10°-20° giorno *post partum*, mentre la metrite di grado II è la metrite puerperale. La metrite di grado III è anche detta metrite settica: si tratta di una possibile evoluzione della metrite puerperale quando il batterio (normalmente *E. coli*), responsabile dell'infezione uterina, passa in circolo.

L'endometrite è un processo infiammatorio cronico dell'endometrio, che si sviluppa dopo la terza settimana *post partum*. Può essere classificata come clinica e subclinica: la prima è caratterizzata da perdite vaginali di tipo purulento o muco-purulento, visibili 21-26 giorni dopo il parto, mentre la seconda è un processo infiammatorio cronico dell'endometrio senza perdite vaginali (o nel vestibolo). Tale processo infiammatorio è caratterizzato dalla presenza di polimorfonucleati (PMN) nel citologico uterino (*cytobrush* o *cyto flushing*) in una percentuale superiore al 18% quando realizzato 21-33 giorni *post partum* e superiore al 10% se effettuato 34-47 giorni *post partum*.

Epidemiologia

È necessaria una doverosa premessa: nonostante già a partire dal 2006 si sia cercato di standardizzare la terminologia, così da definire in modo univoco la metrite clinica, l'endometrite clinica e l'endometrite subclinica, esiste ancora una grande disaccordo sulle definizioni delle patologie uterine. Non avendo una definizione universalmente accettata, è evidente che cercare di confrontare i dati relativamente all'incidenza dell'endometrite subclinica diventa un obiettivo arduo. Non è facile definire la reale diffusione dell'endo-

metrite subclinica: l'incidenza dipende infatti dalla definizione che si adotta e, quindi, dai parametri che la definiscono. In questi ultimi anni, molte ricerche si sono concentrate prima di tutto sulla definizione di un metodo diagnostico che consentisse di stabilire l'incidenza della patologia. Inoltre, non si deve sottovalutare il ruolo delle patologie uterine sulla ripresa del ciclo ovarico: la presenza di un'infezione/infiemmazione uterina ritarda la ripresa del ciclo ovarico, sebbene non sia ancora chiaro se esiste un consistente link tra il ritardo nella ripresa della ciclicità ovarica e l'insorgenza dell'endometrite.

La prevalenza dell'endometrite clinica è compresa tra il 18 e il 37%, mentre studi specifici sull'endometrite subclinica hanno rilevato una prevalenza del 12-94%. Chiaramente, la prevalenza dipende molto dal tipo di metodo utilizzato per la diagnosi, dal momento in cui si emette la diagnosi (distanza dal parto) e dalla prevalenza delle tipiche patologie uterine del *post partum*. Gilbert *et al.*, nel 2005, hanno dimostrato che, con l'aumentare dei giorni di lattazione, l'incidenza delle "infiemmazioni" uterine diminuisce, passando dal 100% delle prime 2 settimane *post partum* all'89, 58 e 41% a 4, 6 e 8 settimane, rispettivamente.

1. Fattori di rischio

Sono stati condotti diversi studi per individuare i fattori di rischio delle infiammazioni/infezioni uterine.

Tra i fattori di rischio più importanti per il complesso metrite/endometrite occorre annoverare la ritenzione delle membrane fetali, la gravidanza gemellare, la distocia, la stagione, il BCS, l'aborto, il parto prematuro, il prolasso uterino e lo *stillbirth*. Tuttavia, la correlazione non è particolarmente marcata.

L'aumento dei livelli di aptoglobina nell'immediato *post partum* è stato associato a un aumento di incidenza dell'endometrite, esattamente come un profondo bilancio energetico negativo (NEB), un aumento dei NEFA prima del parto e un aumento del BHB dopo il parto (parametri che indicano una cospicua riduzione dell'assunzione di sostanza secca) sono stati messi in relazione con un aumentato rischio di endometrite *post partum*. Inoltre, una maggiore predisposizione all'endometrite è stata riscontrata anche nelle bovine che soffrono di ipocalcemia, chetosi e/o di dislocazione abomasale.

Per contro, non esistono studi volti a evidenziare i fattori di rischio specifici per l'endometrite subclinica. Gilbert, nel 2005, ha riscontrato un'incidenza dell'endometrite subclinica variabile dal 37 al 74% tra il 40°-60°

giorno di lattazione. Si tratta di una forbice molto ampia, che sta a indicare l'effettiva presenza di fattori di rischio specifici per questa subdola patologia.

Patogenesi

Il sistema immunitario innato rappresenta la prima linea di difesa di un organismo dall'attacco degli agenti esogeni. Gli elementi difensivi che utilizza sono le barriere epiteliali, i peptidi antimicrobici e le proteine del complemento. La sola presenza di una barriera epiteliale o di sostanze antimicrobiche tuttavia non è condizione sufficiente per sostenere l'efficienza del sistema immunitario: affinché esso sia perfettamente funzionante deve essere in grado di riconoscere la presenza di un agente patogeno e, conseguentemente, di distruggerlo. Il sistema immunitario è in grado di riconoscere rapidamente elementi specifici degli agenti microbici (batteri e virus), detti *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Ogni patogeno possiede una serie di molecole che vengono riconosciute dalle cellule epiteliali e dai macrofagi intra ed extravascolari. Si tratta di porzioni molecolari specifiche e ben conservate nel corso dell'evoluzione microbica, come ad esempio alcuni elementi delle pareti batteriche dei Gram negativi (LPS) e delle membrane dei Gram positivi (acido lipoteicoico, peptidoglicani), le flagelline e gli acidi nucleici.

Come fa il sistema immunitario a riconoscere i PAMPs? Il riconoscimento avviene grazie a recettori particolari, noti come *Pattern Recognition Receptors* (PRRs), che possono essere:

- extracellulari, come i recettori per gli LPS, le lectine, la proteina C reattiva, l'amiloide sierica;
- di superficie, come i TLR nei bovini;
- endosomali e citoplasmatici.

Esistono diversi tipi di PAMPs e quattro sono le famiglie principali: i *Toll-Like Receptors* (TLRs), i *Nucleotide Oligomerization Domain-Like Receptors* (NLRs), i *RIG-I-like receptors* e i recettori lectina tipo C. Tutti questi recettori sono espressi da molte cellule, in particolare da quelle del sistema ematopoietico e dalle cellule epiteliali e stromali dell'utero. In quest'ultima sede, rappresentano effettivamente la prima linea di difesa per l'individuazione degli agenti esogeni.

Ogni volta che si forma un legame tra un PAMP e un PRR, viene stimolato un percorso proinfiammatorio con rilascio di innumerevoli citochine e interleuchine, finalizzate al richiamo di cellule del sistema immunitario ad attività battericida o viricida.

1. Toll-like receptors (TLRs)

I TLRs sono glicoproteine transmembranarie con un dominio N-terminale esterno, ricco di leucina. Questa porzione terminale, effettivamente, media il legame con i PAMPs, in seguito al quale si attiva nella regione interna una cascata di proteine segnale. In particolare, le proteine *chinasi* permettono la produzione di NF- κ B con conseguente rilascio di citochine, interleuchine e prostaglandine. Esistono diversi tipi di TLR (tabella 1), ognuno dei quali lega specifiche porzioni o frammenti di agenti patogeni. Inoltre, possono essere localizzati sulla membrana cellulare o sulla membrana dell'endosoma.

2. Nucleotide Oligomerization Domain-Like Receptors (NLRs)

Questa famiglia è costituita da 23 proteine citosoliche caratterizzate dalla presenza di una porzione altamente conservata ricca in leucina, chiamata Nod. Il dominio di questa proteina include una regione di legame con un aminoacido terminale, responsabile dell'interazione con altre molecole proteiche o con altri domini di proteine (ad esempio, le caspasi - CARD). Dopo tale legame, il Nod oligomerizza le proteine a livello del carbossile terminale del recettore NLR, al fine di autoregolare la propria attività. Al contrario dei TLR, che mediano un riconoscimento extracellulare del patogeno, questi recettori individuano un microrganismo nel citosol. Sebbene TLRs e NLRs differiscano nelle modalità di riconoscimento del patogeno, condividono domini simili ricchi di leucina per individuarlo e cooperano per amplificare la risposta immunitaria. Variazioni dei geni codificanti per questi recettori possono comportare disordini infiammatori e aumento della suscettibilità alle infezioni. Ad esempio, per individuare alcuni batteri, come *Shigella* o *E. coli* enteroinvasivi, si ha un'interazione tra

Nod1 e CARD4 in grado di riconoscere un particolare peptidoglicano, l'acido meso-diaminopimelico, tipico dei batteri Gram positivi e della maggior parte dei Gram negativi. Questo acido giunge nel citosol della cellula attraverso l'invasione della cellula stessa o attraverso meccanismi di trasporto attraverso la membrana, indotti dal batterio stesso.

Per contro, il complesso Nod2 e CARD15 riconoscono la presenza di batteri grazie a un dipeptide muramico, conservato in tutti i tipi di peptidoglicani. Data la sua ubiquitarieità, Nod2 funziona come un sensore intracellulare generico di batteri, al contrario di Nod1, che lega molecole più specifiche. Quindi, la stimolazione di Nod1 e Nod2 da parte dell'acido meso diamino-pimelico e del peptide muramico causa un'oligomerizzazione del recettore di NLR e il reclutamento di proteine chinasi. Questa dimerizzazione, a sua volta, attiva l'NF- κ B, che induce la trascrizione di geni coinvolti nella risposta immunitaria. L'attivazione di altri due NLRs, detti ipaf e cri-pirina, da parte delle flagelline e dell'acido urico comporta la formazione di altre molecole indispensabili per l'attivazione delle caspasi. Queste ultime, in particolare le caspasi 1, clivano le proforme inattive di IL-1 e IL-8 a quelle effettivamente mature per esplicare l'attività pro-infiammatoria.

Al contrario dell'epitelio delle vie aeree, le cellule dell'epitelio gastrico e intestinale sono carenti di TLR e, pertanto, devono ripiegare su percorsi alternativi, quali appunto gli NLRs.

A livello uterino, l'attività di Nod1 e Nod2 non è ben chiara come nelle barriere mucosali. Si è osservato che Nod1 è importante per l'induzione delle β 2-defensine, molecole di difesa mucosali. Nod2, oltre ad attivare l'espressione di altri peptidi antimicrobici, attiva diverse famiglie di ciclossigenasi e, infine, promuove il reclutamento dei neutrofilii nel-

Tabella 1. Localizzazione e ligandi dei principali TLR

TLR	Localizzazione	Ligando
TLR1	Membrana plasmatica	Lipopeptidi tri-acilati
TLR2	Membrana plasmatica	Peptidoglicani, acido lipoteicoco
TLR3	Membrana endosomiale	RNA a singolo filamento; DNA a doppio filamento
TLR4	Membrana plasmatica	LPS, acido lipoteicoco, fibronectina, mannani
TLR5	Membrana plasmatica	Flagelline
TLR6	Membrana plasmatica	Lipopeptidi di-acilati, zimogeni fungini
TLR7	Membrana endosomiale	RNA a singolo filamento
TLR8	Membrana endosomiale	RNA a singolo filamento

la sede dell'infiammazione. Pertanto la sua importanza non è da trascurare in sede uterina.

3. RIG-I-like receptors

Il ruolo esercitato da questi recettori nelle patologie uterine, in pratica, è sconosciuto. Essi giocano un ruolo importante nelle infezioni virali perché promuovono la produzione di interferone. Pertanto, è ancora da indagare l'importanza in corso di infezioni da BVD o BoHV4, virus con tropismo per l'apparato riproduttivo.

4. Recettori lectina tipo C

Questi recettori individuano e legano determinati carboidrati, grazie a un dominio corretto, in grado di riconoscerne vari tipi. Sono localizzati su varie cellule del sistema immunitario, quali neutrofilii, macrofagi, monociti e cellule dendritiche. Possono legare mannosio, fucosio e altri polimeri delle pareti batteriche o fungine. L'effetto ultimo di questo legame è sempre l'attivazione della cascata del complemento e della chemotassi neutrofilica.

Rapporto tra sistema immunitario ed endometrite

È difficile cercare di spiegare una patologia del *post partum* cercando di ricondurla a una singola causa. Trattandosi di biologia, ogni evento è l'esito di percorsi molto complessi, che si intrecciano sempre tra loro. Nel caso delle endometriti, la patologia è il risultato di legami molto stretti tra sistema immunitario e stato metabolico. Il bilancio energetico negativo (NEB), l'ipoglicemia e l'insulino-resistenza interagiscono strettamente per influire sui recettori e sulla produzione di proteine infiammatorie.

L'endometrio sano esprime mRNA per tutti i recettori evidenziati in precedenza, comportandosi esattamente come qualsiasi altro distretto dell'organismo. Tuttavia, *in vitro*, è stata osservata una maggiore espressione dei TLR rispetto agli altri recettori. Il trattamento *in vitro* delle cellule endometriali con LPS è in grado di stimolare la secrezione di un'ampia varietà di citochine e chemochine. In particolare, è stata rilevata una buona concentrazione di mRNA codificante per IL-1, IL-6 e IL-8, mentre nelle cellule epiteliali è stato evidenziato un aumento dell'espressione del peptide linguale e tracheale.

È importante evidenziare l'accumulo di IL-6 osservato nell'utero di bovine affette da endometrite. Normalmente, questa interleuchina è importante non solo localmente, a li-

vello uterino, ma anche perifericamente, in quanto stimola la produzione epatica di proteine della fase acuta, come l'aptoglobina, l' α -glicoproteina acida, la ceruloplasmina e l'amiloide A sierica. Questo, se da un lato dovrebbe favorire la riparazione e la rigenerazione dell'endometrio, dall'altro, trattandosi di animali a elevata produzione e con un forte bilancio energetico negativo (NEB), spesso esita in uno stato infiammatorio cronico. Gli steroidi sono potenti regolatori del sistema immunitario innato e, in particolare, del percorso mediato dai TLR. Progesterone ed estrogeni interagiscono con i processi infiammatori, regolando a livello nucleare l'NFkB e le proteine chinasi. Quindi, di primaria importanza per la buona salute dell'endometrio è la ripresa dell'attività ciclica nel post parto. Senza o con un eccesso di ormoni steroidei non si può pensare al corretto funzionamento delle cellule endometriali, dei peptidi antimicrobici e delle cellule immunitarie. In caso di fase luteale prolungata, il progesterone ha altri effetti negativi sul sistema immunitario locale, in quanto diminuisce la sintesi di eicosanoidi e sopprime la risposta linfocitaria.

In seguito al legame con gli LPS, le cellule endometriali esprimono altri recettori, chiamati EP2 ed EP4, necessari per la risposta alle prostaglandine E. La captazione degli LPS da parte delle cellule endometriali stimola l'accumulo di PGE piuttosto che PGF, elemento che può spiegare sia l'allungamento delle fase luteale sia le alterazioni nella normale risposta infiammatoria endometriale. In una normale situazione di luteolisi, le cellule endometriali dotate di recettori specifici rispondono prima a un picco di ossitocina per poi rilasciare le PGF 2α . Quando le cellule endometriali sono trattate con LPS, neppure l'ossitocina è in grado di prevenire l'accumulo di PGE o reindirizzare verso la produzione di PGF 2α . Questo cambio nel rapporto PGE:PGF potrebbe essere un importante meccanismo di alterazione della luteolisi e giocare un ruolo centrale nelle endometriti o nelle infezioni uterine delle bovine, analogamente a quanto accade con le forme infiammatorie uterine nella donna. L'accumulo di PGE, a sua volta, si può spiegare grazie a due meccanismi:

- variazioni nell'espressione dell'enzima prostaglandina sintasi nelle cellule endometriali: i due enzimi sintasi coinvolti, la PGE sintasi e la PGF sintasi, utilizzano lo stesso substrato, la PGH. Fino ad ora, non si sono trovate differenze di espressione di questi due enzimi tra cellule endometriali sane o trattate con LPS;
- variazioni nell'espressione della fosfolipasi

A2: esistono almeno 14 gruppi di fosfolipasi A2, con considerevoli differenze tra specie e tessuti. Nell'utero della bovina, si ritrovano la fosfolipasi A2G4C e la 2G6. Quest'ultima aumenta di concentrazione quando le cellule endometriali sono stimolate con LPS, suggerendo una possibile spiegazione per l'accumulo di PGE.

Se fino ad ora si è parlato di recettori, alla fine bisognerebbe capire come si comportano nel post parto le principali cellule immunitarie, i macrofagi e i neutrofili. La loro attività è molto compromessa durante questo periodo, dato che giocano a sfavore tutte le situazioni metaboliche tipiche del post parto, quali insulino-resistenza, ipoglicemia e stress ossidativo.

1. Insulino-resistenza

Studi nell'uomo hanno reso note le correlazioni tra obesità, insulino-resistenza e infiammazione cronica, che prende il nome di "sindrome metabolica". L'obesità altera tutto l'assetto endocrino poiché vi è un costante rilascio di acidi grassi, ormoni e molecole pro-infiammatorie. Parallelamente, una bovina che si trova in una condizione corporea elevata al momento del parto e che subisce poi un rapido dimagrimento si trova di fronte alla stessa situazione metabolica. Gli umani obesi possiedono un'aumentata produzione di $TNF\alpha$, IL-6 e altre proteine chemoattraenti per i monociti e i macrofagi. Inoltre, possiedono anche una maggiore espressione di TLR, potenziale elemento predisponente all'iperstimolazione da parte di agenti esogeni che possono legare tali recettori. In generale, si può affermare che l'obesità determina uno stato di stress cellulare che, a sua volta, attiva uno stato infiammatorio con conseguenze sul metabolismo generale. Si parla quindi di "metainfiammazione" per indicare questo stato caratterizzato da un'infiammazione cronica di basso grado. Inizialmente, l'infiammazione è localizzata nei macrofagi del tessuto adiposo, dopodiché si estendono anche ad altri tessuti, quali muscoli e fegato. Ne consegue che il fegato si trova anch'esso in uno stato pro-infiammatorio ed è indotto a produrre continuamente proteine infiammatorie che possono solo peggiorare eventuali infiammazioni già presenti, quali appunto le endometriti.

2. Ipoglicemia

Tutte le cellule del sistema immunitario, analogamente alle altre, richiedono glucosio per svolgere la loro attività. La mammella consuma il 50-85% di tutto il glucosio circolante, avendo bisogno di circa 72 grammi di gluco-

sio per produrre un chilogrammo di latte. Essendo la captazione mammaria del glucosio insulino-indipendente, a causa della mancanza di GLUT4 in tale sede, ne consegue una forte ipoglicemia negli altri tessuti. È possibile affermare che i difetti del sistema immunitario tipici del post parto sono in parte riconducibili al deficit di glucosio. In particolare, i neutrofili richiedono glucosio per i processi di migrazione, diapedesi, fagocitosi e per l'attività mieloperossidasi. In corso di infezione, se il supporto energetico non è corretto e la bovina si trova in NEB le cellule non funzionano come dovrebbero. A peggiorare il quadro bisogna anche ricordare che, dopo il parto, i depositi di glicogeno sono scarsi: a fine gravidanza e a inizio lattazione, infatti, la glicogenolisi e la glicolisi sono fortemente upregolate dalle necessità del feto e della lattazione. Pertanto, anche i depositi interni ai neutrofili sono veramente modesti.

3. Stress ossidativo

Per stress ossidativo si intende uno squilibrio tra la formazione di radicali dell'ossigeno (ROS) e i meccanismi atti a eliminarli. Le vacche metabolicamente stressate producono un'enorme quantità di ROS, ottenuti dall'attività ossidativa di macrofagi e neutrofili iperattivati. Se la risposta dei ROS è attentamente modulata non sorgono particolari problemi, ma quando la produzione è massiccia o quando i meccanismi detossificanti non funzionano bene si scatena un danno cellulare. L'esposizione di macrofagi e cellule endoteliali al $TNF\alpha$, come accade in caso di insulino-resistenza, incrementa i ROS e, quindi, tutta la cascata infiammatoria.

4. Bilancio Energetico Negativo (NEB)

Le cellule del sistema immunitario risentono anche del NEB. La lipomobilizzazione determina un cambio non solo quantitativo ma anche qualitativo del profilo degli acidi grassi fondamentali per le risposte infiammatorie. Nell'uomo, questi cambi di composizione sono in grado di *down*-regolare o *up*-regolare la risposta infiammatoria, secondo il percorso prevalente. Sebbene nella vacca tali cambi di composizione non siano ben studiate, è verosimile che accada la stessa cosa nelle bovine sottoposte a NEB. In generale, si può affermare che gli acidi grassi omega 6 tendono ad amplificare la risposta infiammatoria, mentre gli omega 3 tendono a risolvere il processo infiammatorio. In caso di shift nella composizione, la risposta infiammatoria si può modificare in un senso o nell'altro. Bisogna ricordare che tutti questi elementi non agiscono direttamente solo sull'endo-

metrio ma indirettamente anche su ovaio e ipotalamo. In corso di patologia uterina, quale appunto un'endometrite, spesso si assiste a una fase luteale prolungata. Quando il fluido follicolare contiene LPS, i TLR4 posti sui recettori della granulosa sono in grado di bloccare l'attività dell'aromatasi. Pertanto, questi follicoli possono avere due destini: ovulare (e spesso la concentrazione di progesterone rimane inferiore a 2 ng/ml) o non ovulare. In quest'ultimo caso, gli LPS determinano un blocco nel rilascio di GnRH e LH a livello ipotalamico, interferendo ulteriormente con l'aromatasi. In corso di infiammazioni croniche e, quindi, anche in corso di endometriti, vi è il rilascio costante dei TNF α . Anch'esso, analogamente agli LPS, interferisce con la produzione di estradiolo e determina una minor risposta ovulatoria.

In ultima analisi, non bisogna dimenticare il *drive* genetico che ha permesso di ottenere animali sempre più produttivi, ma non sempre più sani. Variazioni genetiche anche di un solo aminoacido hanno spesso ripercussioni su vari tratti metabolici e immunitari di non trascurabile importanza. Analizzando alcuni tratti immunitari importanti, quali le proteine sieriche appartenenti al sistema immunitario innato e le popolazioni leucocitarie, sono state osservate correlazioni con tutte le patologie delle bovine. Anche se non specifico per le endometriti, nelle vacche con disordini riproduttivi è emersa una più alta percentuale di CD8+ rispetto alle sane. I neutrofili di vacche non sane, inoltre, mostrano un deficit di espressione di alcune molecole proteiche importantissime per la marginazione e la migrazione nei tessuti. Se in parte si tratta di un difetto genetico, tali molecole sono *down*-regolate dagli ormoni steroidei, in particolare dal cortisolo. Questo permette di capire, tra i vari elementi, l'importanza fondamentale dello stress nel determinare questa complessa patologia.

Sintomatologia

L'endometrite subclinica è caratterizzata dall'assenza di segni clinici. Non sono presenti perdite vaginali e tanto meno è possibile rilevare la presenza di materiale purulento o muco-purulento nel vestibolo della vagina.

Diagnosi

Non esiste una grande correlazione tra i segni clinici di endometrite e il reperto citologico. È stato proposto che l'endometrite clinica e l'endometrite citologica possano essere considerate come due entità patologi-

che distinte. Inoltre, la presenza di perdite vaginali, così come la presenza di materiale purulento o muco-purulento nel vestibolo, non sono necessariamente correlate a un'infiammazione uterina (*Purulent Vaginal Discharge*, PVD). La presenza di materiale purulento o muco-purulento nel lume uterino è stato associato a una crescita batterica e a un ritardo di involuzione uterina. Tuttavia, ciò non significa che i batteri siano ancora presenti nell'utero.

1. Biopsia

Le prime applicazioni della biopsia uterina risalgono agli anni '60 e furono effettuate nella cavalla, con lo scopo di studiare l'infertilità in questa specie. La tecnica è oggi impiegata routinariamente nella cavalla anche prima dell'accoppiamento, per verificare la idoneità della fattrice.

Si tratta di un metodo sicuramente in grado di stabilire definitivamente se è o non è presente un processo infiammatorio dell'utero, permettendo anche di stabilire l'entità dell'infiammazione. È tuttavia un esame indaginoso e troppo costoso per vederne l'applicazione routinaria nel bovino in campo. Non si deve neppure sottovalutare il rischio di compromettere la futura fertilità della bovina. Vi è una certa riluttanza a utilizzare questa metodica, anche per il rischio che si correrebbe di sviluppare patologie uterine secondarie a seguito di un improprio uso della tecnica. Inoltre, si deve tener presente che la lettura delle biopsie richiede molta esperienza.



Foto 4. La vaginoscopia è un pessimo metodo per la diagnosi di endometrite subclinica, ma è più accurata dell'esame manuale transrettale (foto G. Gnemmi).

Finestra 1. Come realizzare una biopsia uterina

Introdotta la coda della bovina in un guanto da esporazione rettale, la stessa viene portata cranialmente e dorsalmente al legamento sacro-ischiatico, bloccandola alla spalla controlaterale. Eliminata la materia fecale dal retto, la regione perineale è lavata, detergata e disinfettata (foto 1). Lo strumento da biopsia si trova all'interno di una guaina sanitaria (morbida o rigida), che viene rotta (camicia morbida) o attraversata (camicia rigida) dopo aver superato la prima o la seconda plica cervicale. La biopsia si realizza circa 3 cm dopo la biforcazione dell'utero: la posizione della punta dello strumento è determinata per via trasrettale, con la mano guida (foto 2). Si aprono le ganasce della pinza da biopsia e, aiutandosi con la mano guida, si schiaccia delicatamente la superficie dell'utero all'interno delle ganasce della pinza, che vengono serrate. A questo punto si estrae la pinza dall'utero e il tessuto tra le ganasce della pinza viene rimosso e posto in piastra di Petri, con esposizione della superficie endometriale. Questo campione è sezionato in due parti che vengono poste in una provetta da 1,5 ml e conservati in formalina 10%. I campioni fissati in formalina sono poi inclusi in paraffina, realizzando sezioni di 5-6 mm di spessore, che saranno poi colorate con ematossilina-eosina (H&E). Per le analisi molecolari, il tessuto è criconservato in azoto liquido a -80 °C, fino a processamento (foto 3).



Foto 1. La biopsia uterina si realizza ricorrendo a un'epidurale con lidocaina 2%. In caso di animali particolarmente nervosi, è necessaria anche una leggera sedazione (foto J. De LaMata).



Foto 2. Svuotato il retto dalla materia fecale, la regione perineale è lavata, detergata e disinfettata. Lo strumento utilizzato per la biopsia è inserito nel vestibolo vaginale all'interno di una camicia sanitaria (foto J. De LaMata).



Foto 3. Per le analisi molecolari, il tessuto è criconservato in azoto liquido a -80 °C (foto G. Gnemmi).

La biopsia è un metodo diagnostico che trova una sua posizione nel campo della ricerca, soprattutto per approfondire i meccanismi immunitari in sede uterina o per studiare il comportamento dei recettori dell'ossitocina. Tuttavia, anche per questi scopi non la si applica ancora sistematicamente, in particolare negli animali da reddito (finestra 1).

2. Vaginoscopia

La vaginoscopia è un pessimo metodo per fare diagnosi di endometrite subclinica.

Si tratta di un esame collaterale che può essere utile per approfondire un problema individuale di infertilità, ma trova scarso impiego per un uso routinario in condizioni di campo. Si tratta di un metodo per certo più accurato rispetto alla diagnosi manuale trasrettale (foto 4).

La vaginoscopia è una tecnica che presenta una bassa specificità: l'assenza di materiale

purulento o muco-purulento non permette di escludere un'infezione uterina. Anche la sensibilità non è molto alta: la presenza di perdite vaginali purulente o muco-purulente non sempre è correlabile a una infiammazione uterina. Drillich *et al.* nel 2004, hanno sottolineato una sensibilità del 12,3% e una specificità del 90,2% quando si fa un confronto con la citologia uterina. LeBlanc *et al.*, nel 2002, hanno invece indicato una sensibilità del 20% e una specificità dell'88%.

3. Metricheck

Il metricheck è un altro pessimo metodo per fare diagnosi di endometrite subclinica.

Si tratta di uno strumento ampiamente utilizzato in alcuni paesi (Nuova Zelanda), dove ha avuto un grande successo in ragione del metodo di allevamento. È considerato un metodo rapido per fare una diagnosi di endometrite clinica, ma è discutibile la sua accu-



Foto 5. L'esame ultrasonografico in stalla è realizzato con unità ultra-portatili o portatili. Entrambe queste unità sono auto alimentate: hanno un'autonomia di 2-8 ore, in base alle diverse unità. In riproduzione bovina si utilizzano sonde lineari, settoriali o curvilinee, di 5,0-7,5 MHz (foto G. Gnemmi).

ratezza per la possibilità di avere un'infezione uterina senza perdite vaginali oppure di avere perdite vaginali purulente o muco-purulente senza infiammazione uterina.

4. Diagnosi ultrasonografica

L'esame ultrasonografico permette di realizzare in tempo reale una diagnosi di endometrite subclinica, garantendo non solo elevata specificità ma anche alta sensibilità.

L'esame ultrasonografico dell'utero permette la rilevazione del contenuto uterino in tempo reale; la diagnosi di endometrite è quindi relativamente semplice (foto 5). Studi abba-

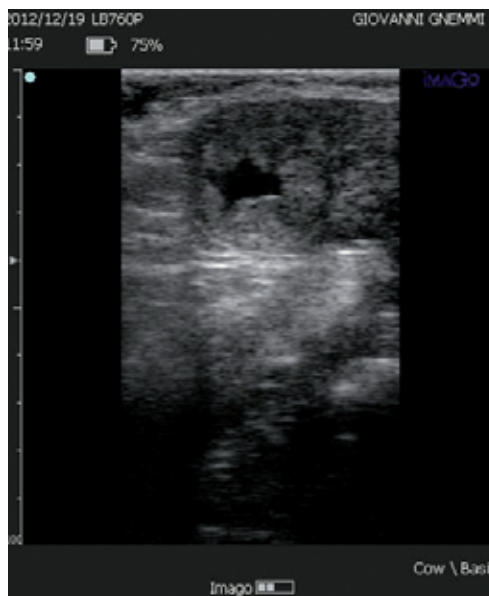


Foto 6. La presenza di liquido all'interno dell'utero e/o lo spessore dell'endometrio superiore a 8 mm non permettono di realizzare una diagnosi di endometrite subclinica. In presenza di un profilo estrogenico (proestro-estro-metaestro), nell'utero è possibile trovare fluidi (> 3 mm) e lo spessore dell'endometrio è superiore a 8mm (foto G. Gnemmi).

stanza recenti hanno mostrato una debole correlazione tra l'esame citologico e l'esame ultrasonografico per la diagnosi di endometrite. Gli studi che sono stati fatti per valutare l'accuratezza dell'ultrasonografia per la diagnosi di endometrite clinica e subclinica sono tutti basati sullo spessore dell'endometrio e sulla quantità del liquido presente nell'utero.

Secondo Barlund e Palmer, la diagnosi ecografica di endometrite subclinica si realizza misurando lo spessore dell'endometrio e il diametro del contenuto uterino. Il *cut off* per l'endometrio è di 8 mm mentre il *cut off* per il lume uterino è di 3 mm; utilizzando questi due parametri la diagnosi è ovviamente poco accurata. La sensibilità del metodo è molto bassa (molti i falsi positivi). In presenza di un profilo estrogenico (proestro, estro, metaestro), lo spessore dell'endometrio e il diametro del lume uterino supera i limiti proposti da Barlund. In sostanza, circa 9 giorni di un ciclo di 21 possono essere confusi per un'endometrite subclinica se la diagnosi è realizzata seguendo le indicazioni di Barlund. Utilizzando l'ecografia in modo corretto è possibile realizzare una diagnosi di endometrite subclinica accurata e in *real time*, ma soprattutto senza questo margine di errore.

Valutando la mappa follicolare, si può capire

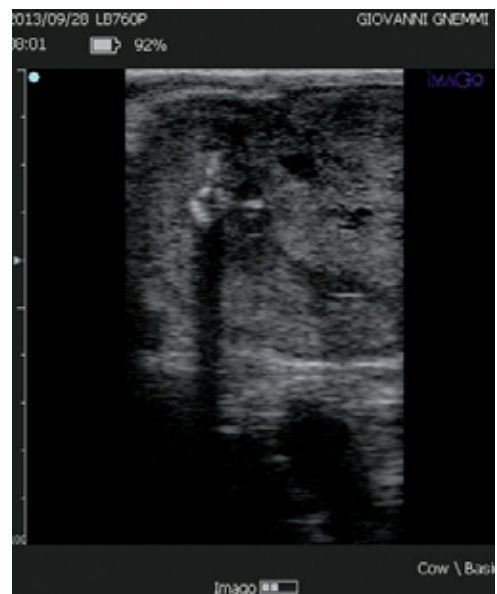


Foto 7. La diagnosi ultrasonografica di endometrite subclinica è possibile in tempo reale: non si deve fare una diagnosi differenziale tra l'endometrite subclinica e il proestro-estro-metaestro. In caso di endometrite subclinica, è possibile trovare coni d'ombra e il materiale purulento o muco purulento all'interno dell'utero è speculare al profilo endometriale. I riflessi speculari sono invece indipendenti dal profilo endometriale (foto G. Gnemmi).

la fase del ciclo estrale in cui la bovina si trova (profilo estrogenico o progestinico). È possibile valutare la quantità del liquido presente in utero (valutando anche la sua ecogenicità), verificando la presenza di artefatti e il tipo di artefatti presenti. In prossimità del calore (prima durante e dopo l'ovulazione), sono presenti dei riflessi speculari che, di fatto, consentono di considerare non patologico lo spessore dell'endometrio e il diametro del lume uterino (foto 6). La presenza di coni d'ombra (*shadow*), indipendentemente dallo spessore dell'endometrio e dal diametro del lume uterino, indica sempre un'endometrite subclinica (foto 7).

Possono per altro essere presenti bovine in calore con un'endometrite subclinica; in questo caso, il reperto ecografico è caratterizzato dalla presenza di un ispessimento dell'endometrio (tendenzialmente anche poco ecogeno), da una contrazione del miometrio (anche molto ecogeno), da una dilatazione della tonaca vascolare e da un contenuto uterino torbido, con un effetto a bufera di neve. Sono presenti anche rari riflessi speculari.

5. Diagnosi citologica

La diagnosi di endometrite subclinica fondata sulla determinazione dei PMN si basa su un concetto molto semplice: un processo infiammatorio dell'utero causa sempre una migrazione di PMN, che rappresentano la prima linea di difesa nei confronti dell'agente infettivo.

Si tratta di un test relativamente accurato e sicuramente meno invasivo di una biopsia. Il *cytobrush* o il *cyto flushing* stabilisce la presenza di un processo infiammatorio dell'utero sulla base della percentuale di PMN presenti. Per l'endometrite subclinica, questo esame è considerato il gold standard rispetto alle altre tecniche diagnostiche, ma non lo è affatto (finestra 2).

Il *cytobrush* rispetto al *cyto flushing* è una tecnica più affidabile: richiede meno tempo per essere realizzata e, normalmente, non si han-

no prelievi a vuoto (circa il 17% dei *cyto flushing* è a vuoto); inoltre, il numero di campioni con cellule alterte è nettamente inferiore. Kasmanickam *et al.* indicano un *cut off* >10% di PMN per poter parlare di endometrite a 34-47 giorni *post partum*; secondo Gilbert *et al.* un valore >5% di PMN è significativo di una infiammazione endometriale a 40-60 giorni *post partum*.

6. Reagent test strip

Le strisce reattive impiegate per la valutazione delle urine sono state impiegate anche nella valutazione dei PMN a livello di cervice. Tuttavia, i risultati fino a oggi ottenuti dimostrano una scarsa accuratezza di queste strisce se confrontate con un test come la citologia.

Terapia

1. Tempo

Circa il 70% delle endometriti guarisce spontaneamente nei primi 60 giorni *post partum*, senza ricorrere a nessuna terapia.

2. Terapia generale.

La terapia antibiotica e/o con chemioterapici per via generale non trova riscontri positivi in bibliografia. Inoltre, l'endometrite è per lo più un'infiammazione e non un'infezione cronica dell'endometrio; pertanto, diventa difficile giustificare l'utilizzo di un antibiotico e/o di un chemioterapico.

3. Terapia locale

La terapia intrauterina si basa sull'introduzione in utero di un antibiotico o di soluzioni debolmente irritanti. La terapia antibiotica è stata ampiamente utilizzata in campo; oggi, stabilito che l'endometrite è un'infiammazione e non un'infezione, è difficile giustificare l'utilizzo. La terapia antibiotica intrauterina, quando confrontata a un trattamento con prostaglandina (in presenza di corpo luteo) non permette di ottenere migliori risultati.

4. Prostaglandine

Si tratta di una terapia molto utilizzata. Tuttavia, non vi sono prove scientifiche della reale efficacia delle prostaglandine naturali o sintetiche nella terapia dell'endometrite (clinica e/o subclinica), quando utilizzate prima della fine del tempo d'attesa volontario. Le prostaglandine utilizzate a partire dalla fine del tempo di attesa volontario sono invece efficaci se utilizzate in presenza di un corpo luteo.

La terapia dovrebbe comunque essere finalizzata all'ingravidamento piuttosto che alla

Finestra 2. I polimorfonucleati neutrofili (PMN)

I polimorfonucleati neutrofili (PMN) sono, tra le cellule di tipo infiammatorio, quelle che predominano nei liquidi presenti nel lume di un utero infiammato. È possibile utilizzare il valore di PMN a 30 giorni *post partum* per predire quali saranno le performance riproduttive della bovina: con un valore a 30 giorni *post partum* > 18% la bovina avrà quasi certamente un allungamento dell'interparto.

Finestra 3. Cytobrush

Introdotta la coda della bovina in un guanto da esporazione rettale la stessa è portata cranialmente e dorsalmente al legamento sacro-ischiatico bloccandola alla spalla controlaterale. Eliminata la materia fecale dal retto la regione perineale è lavata detersa e disinfettata.

Per questo esame si possono utilizzare sistemi già confezionati, oppure si possono utilizzare sistemi artigianali. I sistemi preconfezionati sono adattati da quelli in uso nella cavalla. Le dimensioni sono di 4-5 mm (diametro) x 82 cm, ma sfortunatamente sono flessibili, cosa che rende spesso difficile il passaggio della cervice, se non impossibile nelle bovine al 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 (foto 8).

Una volta superata la cervice e il corpo dell'utero, si imbecca la direzione del corno uterino in cui quale si intende realizzare la campionatura e facendo roteare lo scovolino sull'adiacente endometrio si realizza il prelievo di cellule ivi ubicate (foto 9).

Esteriorizzato il dispositivo, lo scovolino viene fatto roteare su un vetrino (foto 10) e quindi lasciato asciugare all'aria per alcuni secondi.

Il vetrino è così pronto per la colorazione, realizzata generalmente con Wright Giemsa modificato. Colorato il vetrino, si procede alla sua valutazione a 40x, ricorrendo alla conta di almeno 100 cellule (cellule endometriali, PMN, cellule squamose).



Foto 8. Il *cytobrush* si realizza all'interno del corno uterino, nel terzo posteriore dell'utero, 2-3 cm cranialmente alla biforcazione dell'utero (foto G. Gnemm).



Foto 9. Il dispositivo è dentro una camicia sanitaria, che viene sfilata una volta all'interno della cervice. Si deve superare la cervice con cautela, senza danneggiare le pieghe cervicali: questo, soprattutto nelle bovine al primo parto, può richiedere qualche minuto (foto G. Gnemm).



Foto 10. Realizzato il prelievo, si estrae il dispositivo e lo scovolino viene fatto ruotare su un vetrino e lasciato asciugare all'aria per qualche secondo (foto G. Gnemm).

sola cura del "sintomo". A tale scopo è possibile includere in un programma di sincronizzazione, come il Presynch-Ovsynch, tutte le bovine con endometrite che alla fine del tempo di attesa volontario hanno un corpo luteo. Il tasso di concepimento in questi animali è sovrapponibile a quello ottenibile da bovine immesse nel programma senza endometrite; il tasso di morte embrionale tardiva sarà invece superiore nelle bovine con endometrite rispetto a quelle senza endometrite.

5. Flushing terapeutico

Alla fine del tempo di attesa volontario, alcuni animali con endometrite subclinica possono non avere un corpo luteo. In questi animali, non è possibile ricorrere alla prostaglandina, ma è possibile realizzare un *flushing* terapeutico con soluzione fisiologica (25-30 °C) o PBS.

6. Soluzioni debolmente irritanti

La soluzione jodo jodurata di Lugol al 3-5% è stata utilizzata per lungo tempo nel tratta-

mento dell'endometrite. Non si devono superare i 100 centimetri cubici per corno uterino. L'aumento delle concentrazioni e/o un'eccessiva frequenza dei lavaggi possono provocare la degenerazione irreversibile dell'endometrio (fibrosi) che, se bilaterale, compromette il futuro riproduttivo della bovina.

Costi della patologia

Il costo dell'endometrite è per lo più dipendente dall'aumento dei costi occulti: minor produzione, aumento della riforma involontaria, minore fertilità.

L'endometrite subclinica è responsabile di peggiori *performances* riproduttive e può essere causa di eliminazione involontaria per infertilità.

Dato l'aumento del numero delle inseminazioni per gestazione, determina un aumento dell'intervallo parto-prima IA e parto-concepimento. Anche il tasso di concepimento, soprattutto quello alla prima IA, diminuisce. Infine, si ha un generale aumento dei giorni *open*.

* Il materiale accessorio è disponibile per tutti gli utenti FAD nell'area personale della piattaforma, all'indirizzo www.pviformazione.it. Tale materiale non è oggetto di domande del questionario di valutazione dell'apprendimento FAD.