

Diagnóstico de endometritis en la yegua. Reflexiones y evidencias sobre los métodos y sus resultados

Luisina Chapero¹, Melina Pietrani^{2, 4}, Luis Losinno^{3, 4}

¹Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa, Argentina. ²Medicina Veterinaria, Instituto Académico Pedagógico de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Nacional de Villa María, Argentina. ³Laboratorio de Producción Equina y ⁴Maestría en Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Resumen

La endometritis es la causa más frecuente de subfertilidad en yeguas; las cuales pueden tener un ciclo estral normal, pero no se preñan, o pueden preñarse y luego sufrir una pérdida embrionaria temprana. Los signos clínicos más frecuentes de endometritis son fluido intrauterino, edema uterino excesivo, descarga vulvar, ciclos estrales anormales, entre otros. Sin embargo, en el caso de la endometritis sub clínica, la ausencia de estos signos puede dificultar su detección y diagnóstico. Existen diversos métodos de recolección de muestras, tales como hisopo, cepillo, lavado uterino o biopsia. Cada uno tiene diferente alcance en cuanto a superficie y profundidad del endometrio, y diferentes grados de sensibilidad y especificidad. A partir de estas muestras pueden seleccionarse diferentes métodos de diagnóstico de laboratorio como citología endometrial, cultivo e histopatología, los cuales se utilizan para evaluar el grado de inflamación y/o infección. El objetivo de este artículo es reflexionar sobre la evidencia disponible de la sensibilidad y especificidad de los diferentes métodos de toma de muestra y diagnóstico, y sobre la interpretación correcta de los resultados para llegar a un diagnóstico y tratamiento adecuado. Además, se presentarán nuevas técnicas diagnósticas en la práctica de la reproducción equina.

Palabras claves: endometritis, fertilidad, reproducción equina

Abstract

Endometritis is the most common cause of subfertility in mares; which may have a normal estrous cycle, but fail to become pregnant, or suffer early embryonic loss. The most frequent clinical signs of endometritis are free intrauterine fluid, excessive uterine edema, vulvar discharge, abnormal estrous cycles, among others. However, in the case of subclinical endometritis, the absence of these signs can make detection and diagnosis more difficult. There are a variety of sample collection methods, such as swab, cytobrush, uterine lavage, or biopsy, each covering a different range and depth of the endometrium and possessing different degrees of sensitivity and specificity. To evaluate these samples, different laboratory diagnostic methods

Chapero *et al.*

Diagnóstico de endometritis [...]

such as endometrial cytology, culture and histopathology can be selected, which are used to evaluate the degree of inflammation or infection. The aim of this article is to discuss available evidence on sensitivity and specificity of the current sampling and diagnosis methods, and interpretation to arrive at an adequate diagnosis and treatment. In addition, new diagnostic techniques in equine reproduction practice will be presented.

Keywords: endometritis, fertility, equine reproduction

Introducción

La endometritis es la causa de infertilidad reportada con mayor frecuencia en yeguas. Sin embargo, aún representa un problema a resolver desde el punto de vista del diagnóstico, a pesar de la disponibilidad de pruebas de aceptable sensibilidad y alta especificidad, en especial en la presentación subclínica. Su impacto económico es significativo, ya que las yeguas afectadas a menudo tienen ciclos estrales irregulares, requieren un manejo clínico reproductivo intensivo, tratamientos, un mayor número de dosis de semen y de ciclos para quedar preñadas (si es que lo logran), incurriendo en costos adicionales (Scoggin, 2015; Troedsson, 2016).

Para poder diagnosticar la endometritis (y particularmente la subclínica), es necesario detectar los factores predisponentes y los escenarios a los que nos podemos enfrentar. Algunos de ellos podrían ser: 1) control reproductivo pre-temporada; 2) pre-inseminación con semen congelado, para descartar endometritis subclínica, debido a que el servicio/inseminación puede predisponer a la activación de bacterias latentes o instaurar un estado inflamatorio persistente; 3) yegua problema, basado en la edad y/o historia reproductiva; entre otros posibles escenarios.

Luego de la primera evaluación clínica reproductiva, de la que debe surgir la indicación de realizar un muestreo, el primer desafío para el veterinario será seleccionar el o los métodos y procedimientos apropiados para cada yegua y cada situación en particular, considerando: 1) las características especiales de cada individuo (edad, número de partos, estado de las barreras físicas de protección uterina, historia reproductiva previa, estado del útero a la ecografía, etc.); 2) el contexto (físico, económico, temporal); 3) la disponibilidad (de instrumentos, laboratorios, logística); 4) el conocimiento y el entrenamiento de cada profesional. Allí está la primera gran decisión. El siguiente desafío será la correcta aplicación de la/s técnica/s seleccionadas, y envío de las muestras al laboratorio en el menor tiempo posible y acondicionadas correctamente.

Hasta un punto, aquí termina la primera parte de lo que podría ser “controlado” por el veterinario ambulatorio: el correcto envío de una muestra debidamente obtenida. Luego, comienza algo que, en general, no solo está fuera de nuestro control sino, muchas veces, hasta de nuestro conocimiento real de lo que ocurre. Si no existe un alto grado de confianza y de conocimiento de lo que sucede con el procesamiento de las muestras, es tiempo, energía, dinero y expectativas potencialmente “perdidas”. Sabemos (o deberíamos saber) que los procesos en el laboratorio tienen un rango estandarizado y establecido de tiempos. El procesamiento y lectura de una citología endometrial debería demorar 24 horas máximo (pero podría ser 1 hora o menos); 48-72 horas máximo para un cultivo bacteriológico standard y 5 días para una histopatología (si se la realizara de forma lenta). Lo que queremos transmitir, es que no es un tiempo indefinido, ni “lo que me lleve”, son esos plazos en un laboratorio con protocolos estrictos y de servicios en el que cada cliente es importante. También deberíamos saber cuál es la “ruta” o línea temporal de los procedimientos standard que solicitamos:

Chapero *et al.*

Diagnóstico de endometritis [...]

1) el tipo de tinción/es que se pueden aplicar a una citología endometrial y cuál es la indicada para identificar cada cosa (células inflamatorias, bacterias, hongos);

2) el protocolo básico y mínimo de un cultivo bacteriológico estándar con al menos dos medios de cultivo (por ejemplo agar sangre no selectivo y agar McConkey selectivo para enterobacterias) por 48 horas, que no es lo único ni lo ideal (podría ser además agar cromogénico, Saboureaud, etc), pero es lo básico, menos que eso es inaceptable;

3) hematoxilina-eosina (como básico, existen otros incluso más específicos) para las muestras de biopsia endometrial y un preparado con al menos 3- 4 cortes diferentes en el portaobjetos, teñidos y montados correctamente.

Por último, y no menos importante, será realizar una correcta **interpretación** de los resultados, que dará lugar a un diagnóstico que, eventualmente, podría llevar a la aplicación de un **tratamiento** y luego a un **control** de la respuesta al mismo.

El objetivo de este artículo es comparar las ventajas y desventajas de diferentes técnicas de recolección de muestras, los análisis que se pueden realizar sobre éstas y cómo interpretar los resultados, para que el profesional pueda seguir un correcto camino diagnóstico e instaurar un tratamiento adecuado para la endometritis.

Fisiopatología de la endometritis y presentaciones clínicas

Los principales mecanismos de defensa y respuesta uterinos ante los agentes extraños que pueden tomar contacto con él, ya sean infecciosos o no, son las barreras físicas del tracto reproductivo, el sistema inmune innato y el drenaje (*clearance*) uterino mecánico. Las múltiples pariciones y la edad avanzada pueden causar alteraciones anatómicas tales como una deficiente o incorrecta conformación vulvar y perineal (Figura 1, B y C), esfínter vestibulo-vaginal incompetente, incompetencia cervical, urovagina (Figura 2), urómetra, neumovagina, todos factores que pueden predisponer a la endometritis. La pérdida del soporte estructural del tracto reproductivo y el estiramiento de los ligamentos anchos causan un descenso ventral ("pendular") del útero dentro del abdomen que predispone a la retención de fluido intrauterino (IU), infecciones persistentes y susceptibilidad a la endometritis persistente.

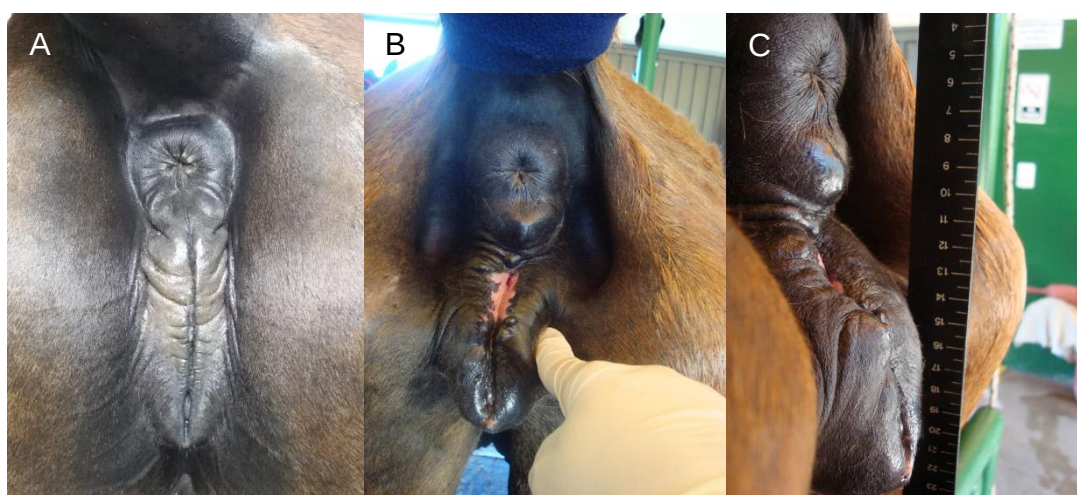


Figura 1. Yegua con adecuada conformación vulvar (A). Yegua con inadecuada conformación vulvar (posición y angulación; B y C).

Las causas de endometritis pueden clasificarse “académicamente” de acuerdo a su etiología en infecciosas (bacterias, hongos, virus) y no infecciosas (en respuesta al semen, orina, aire, tratamientos intrauterinos) o ambas simultáneamente. La endometritis inducida por el servicio natural o inseminación artificial (IA) es una reacción fisiológica en la yegua, necesaria para la eliminación efectiva de las bacterias contaminantes, *detritus* celulares y el exceso de espermatozoides introducidos en el útero (muertos, inmóviles).

La respuesta inflamatoria se caracteriza por la expresión de citoquinas pro y anti inflamatorias, reclutamiento de polimorfonucleares (PMN) y una activación de linfocitos T. La liberación de prostaglandina F2 α por el endometrio produce contracciones miométriales para eliminar el contenido inflamatorio intrauterino (incluyendo el drenaje a través de los vasos linfáticos). Luego de la eliminación de estos productos del lumen uterino, la inflamación disminuye y el ambiente endometrial retorna a su estado normal en un período de 48 a 72 horas.



Figura 2. Inspección transvaginal, acumulación de fluido y orina en el piso de la vagina.

Mientras que los mecanismos de defensa uterina, aseguran una resolución rápida y efectiva de la inflamación en yeguas naturalmente resistentes a endometritis, aquellas que fallan en resolver el proceso inflamatorio son clasificadas como “susceptibles” a endometritis persistente postservicio (EPPS). Esta falla, resulta en acumulación de fluido IU y productos inflamatorios que contribuyen a un estado de infertilidad y muerte embrionaria temprana y que pueden estar involucrados en el desarrollo de la fibrosis endometrial, endometrosis (Canisso y Segabinazzi, 2020).

Las yeguas susceptibles a EPPS pueden ser difíciles de identificar antes del servicio/IA, ya que muchas de ellas no presentan acumulación de fluido IU y/o cultivo y citología uterina positivas antes del mismo. En general, en estas yeguas el diagnóstico ocurre posterior al servicio o inseminación, cuando se presenta alguna evidencia clínica de EPPS como presencia ecográfica de fluido IU, edema y descarga vulvar (Figura 3). Los resultados de laboratorio son, en general, citología endometrial positiva (presencia de PMN) e inflamación aguda superficial o profunda en la histopatología. En general el pronóstico reproductivo es favorable.



Figura 3. Yeguas con descarga vulvar por endometritis supurativa.

Luego de la fase aguda, la EPPS evoluciona hacia un fenómeno subagudo o crónico que puede ser causado por infecciones bacterianas o fúngicas, y puede verse agravado por factores predisponentes como neumovagina, urovagina, incompetencia cervical, útero pendular, edad. El mayor desafío clínico en la endometritis persistente es su presentación subclínica que puede estar asociada a la presencia de biofilms y bacterias latentes, como estreptococos (Katila, 2016).

Aproximación al diagnóstico. Consideraciones sobre los muestreos

El momento más apropiado para el muestreo dependerá de las circunstancias particulares del caso, pero si tenemos al menos una sospecha clínica, mientras más rápido se realice, mejor. No es conveniente dejar progresar estos procesos, ya que sólo contribuirán a empeorar el pronóstico reproductivo. Las muestras para citología endometrial se pueden recolectar en cualquier etapa del ciclo estral, mientras que el mejor momento para realizar un cultivo uterino, puede ser discutible, pero con mayor frecuencia se realiza al inicio del estro. En el mismo, el cérvix está abierto, la recolección de muestras es fácil y el riesgo de infección iatrogénica del útero es mínima.

Debemos considerar que haremos un muestreo invasivo del tracto reproductivo, por lo que la probabilidad de errores y de contaminación no solo es real, sino que se incrementa significativamente. Es frecuente asumir que se tomó bien la muestra y que el procesamiento va a ser correcto, pero muchos pasos en esta cadena de sucesos y procedimientos pueden generar fallas en el diagnóstico y el tratamiento. El muestreo uterino en la yegua es simple, pero las posibilidades de contaminación son altas, ya que los instrumentos tienen que pasar a través del tracto reproductivo caudal el cual presenta abundante microbiota, incluidos los organismos oportunistas potencialmente patógenos y en muchos casos de yeguas con alteraciones en la conformación, restos significativos de orina alrededor del cérvix. La estricta higiene del área perineal y del vestíbulo vaginal en combinación con métodos de diagnóstico apropiados, son esenciales para recolectar muestras representativas y no cometer iatrogenia.

El área perineal debe lavarse apropiadamente antes de cualquier procedimiento reproductivo interno en la yegua, para eliminar los restos de materia fecal (visibles o no) y reducir el número de bacterias potencialmente patógenas que puedan contaminar el tracto reproductivo durante

RESEÑA

Chapero *et al.*

Diagnóstico de endometritis [...]

el procedimiento o la muestra (Figura 4). El lavado debe realizarse con agua corriente (no dentro de baldes o recipientes) de fuente confiable en cuanto a su carga bacteriana. Si la fuente es desconocida o no confiable es conveniente utilizar agua destilada (no estéril) o hervida (en un recipiente manual a presión) dado que hay reportes (y experiencias personales) de contaminación no sólo de las muestras sino de las yeguas (y los padrillos) por el lavado con agua de pozo contaminadas con *Pseudomonas aeruginosa*.

Para el lavado, en primer lugar, debe atarse la cola sobre la manga elevándola y colocar un colero protector o un guante de tacto para cubrir los pelos de la cola. Luego, el área perineal se moja con abundante agua y se enjabona (utilizando siempre guantes descartables) con jabón líquido neutro (no recomendamos el uso de jabón solido ni de soluciones de iodo jabonoso) comenzando por la vulva y ano y luego extendiéndose hacia los laterales; por último se enjuaga con abundante agua a presión. Este procedimiento se repite al menos 3 veces, o hasta que el área se encuentre limpia. Se seca con papel absorbente (no recomendamos el uso de toallas de tela ni algodón). Por último, el vestíbulo vaginal se limpia con algodones embebidos en solución estéril (solución fisiológica o Ringer lactato) utilizando un algodón para cada parte (techo del vestíbulo, paredes y piso); el procedimiento se repite hasta que los algodones salgan limpios.

Figura 4. Lavado perineal y limpieza del vestíbulo vaginal.

La **toma de muestras** endometriales

Chapero *et al.*

Diagnóstico de endometritis [...]

La sensibilidad es la capacidad de detectar verdaderos positivos (yeguas con endometritis), mientras que la especificidad es la capacidad de detectar los verdaderos negativos (yeguas sin endometritis), es decir la probabilidad que para un animal sano se obtenga un resultado negativo. La biopsia endometrial es, hasta el momento, el único método para diagnosticar de manera confiable a las yeguas con endometritis crónica, por lo que es considerada internacionalmente como la prueba estándar o “de oro”. Por eso, los demás métodos diagnósticos se comparan con ésta para calcular la sensibilidad y especificidad. Sin embargo, debe recordarse que todas las técnicas pueden arrojar resultados falsos negativos con mayor o menor probabilidad.

Examen clínico-reproductivo

El examen ginecológico debe realizarse de manera completa y secuencial, comenzando con métodos no invasivos siguiendo después con los invasivos. El examen reproductivo generalmente inicia con la **inspección** de la conformación vulvar y el área perineal, luego con la **palpación** transrectal seguida por la **ultrasonografía**. Recién a partir de estos pasos, y luego del lavado perineal (excepto que se tome una muestra de fosa del clítoris, que debe realizarse antes de esto), se realiza la inspección transvaginal (esfínter vestibular, cérvix, acumulación de fluido en el piso de la vagina, defectos anatómicos, descarga vaginal, laceraciones, várices). Aunque la presencia de fluido IU es un signo clínico frecuente, su presencia no es indicativa de endometritis o susceptibilidad a ella, y la ausencia de fluido IU no excluye la inflamación crónica y/o profunda. O sea, la presencia o no de fluido IU anecoico por ultrasonografía no es un indicador sensible ni específico de endometritis, a pesar de las creencias extendidas al respecto (Figura 5).



Figura 5. Fluido intra uterino ecogénico en yegua post servicio (A). Edema endometrial elevado y fluido intra uterino en cuerpo uterino en yegua en estro (B).

Métodos de muestreo uterino

El **hisopado**, descrito por Knudsen (1964) hace 56 años y el **cepillo** (protegidos y no protegidos) diseñados para su utilización en yeguas (más de 80 cm de largo y con simple o doble cubierta estéril) son métodos de muestreo superficiales, y el proceso de recolección con ambos es similar.

Los cepillos poseen mayor sensibilidad que los hisopos porque recogen mayor cantidad de material celular del lumen uterino generando menor daño a las células, lo que facilita su lectura posterior.

El material recolectado con hisopo o cepillo se puede utilizar tanto para cultivo microbiológico como para citología endometrial, aunque se recomienda la toma de dos muestras (una para cultivo en primer lugar y otra para citología en segundo lugar) con la finalidad de evitar la contaminación. Otra opción para evitar la contaminación, principalmente de la muestra para cultivo, consiste en utilizar un portaobjetos estéril donde realizar primero el extendido para citología e inmediatamente colocar el extremo del mismo hisopo en el tubo con medio de transporte para cultivo. Años atrás, se extendió (y afortunadamente está en desaparición) la creencia que utilizando un modelo de hisopos con una tapa rígida se podía (y era recomendado por el fabricante e inclusive por algunos profesionales y en libros de texto de reproducción equina) tomar una muestra representativa para citología con la tapa y luego continuar como describimos (Figura 6).

Basados en esta creencia, existen en el mercado, algunas marcas de hisopos (con la tapa rígida) para tomas de muestras uterinas en yeguas de muy mala calidad, con los cuales es muy frecuente que durante el procedimiento, ejecutado correctamente por profesionales experimentados, la tapa se desprenda y quede dentro del útero, algo en extremo desagradable dado que es una dificultad y tiempo adicional para retirarlos (habitualmente realizando un lavaje uterino), no sin daños aditivos para la yegua (laceraciones que pueden ser evidenciadas por endoscopia inmediata). Razón adicional para no ser recomendables.

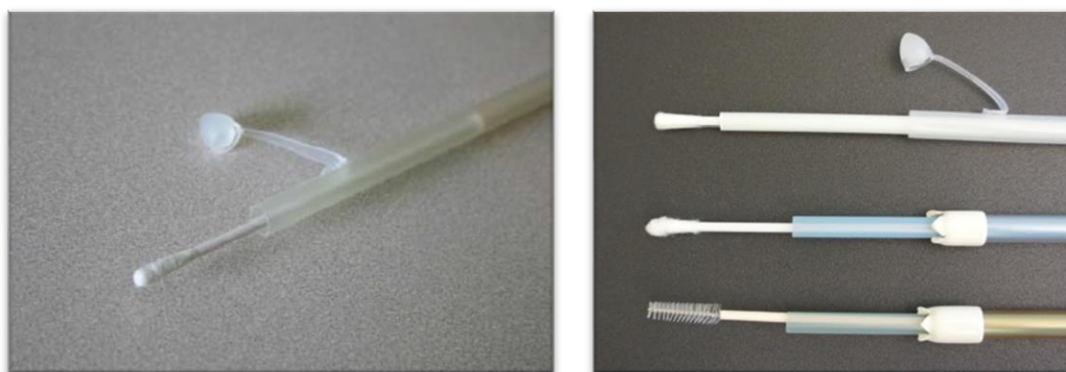


Figura 6. Hisopo cubierto tipo Kalayjian (no recomendable), hisopo protegido y cepillo protegido. Fuente: Dascanio, 2014, *Equine Reproductive Procedures*.

Inmediatamente posterior a la toma de muestra para cultivo, la misma debe colocarse en un medio de transporte apropiado (Stuart, Amies) y refrigerarse para evitar el crecimiento de organismos contaminantes.

Análisis de laboratorio

En general es necesario complementar un cultivo junto a una citología, ya que, evaluados de manera individual, estos análisis difícilmente podrían aproximarnos a un diagnóstico completo. La **citología endometrial** puede realizarse con las muestras provenientes de un hisopo o cepillo, rodando suavemente éstos sobre un portaobjetos, y luego fijando y coloreando la muestra.

Para realizar una citología procedente de un lavaje uterino, el efluente se centrifuga a 300g durante 10 minutos, se descarta el sobrenadante y se toma una muestra del pellet con un hisopo para proceder como se describió anteriormente. También puede realizarse con una muestra de biopsia endometrial, realizando una impronta sobre un portaobjetos estéril (Nielsen, 2005).

Pueden observarse PMN dispersos dentro del estrato compacto y del epitelio sólo durante el estro, pero no durante las otras etapas del ciclo estral. Los neutrófilos estarán presentes en la luz uterina después del servicio/IA, del lavado uterino o infusión, durante el período postparto o en casos de endometritis (Troedsson, 2006).

La detección de un número elevado de neutrófilos en la citología confirma la endometritis. Otros leucocitos como los macrófagos, linfocitos o eosinófilos no se encuentran frecuentemente en los extendidos de citología. Sin embargo, un resultado negativo de una citología hecha con un hisopo, cepillo o LU no descarta la endometritis, ya que estos métodos sólo detectan células inflamatorias que están presentes dentro del lumen uterino y la mucosa superficial (Figura 9). Además, estos exámenes no pueden predecir con precisión el subtipo de endometritis, así como su gravedad ni su distribución superficial o profunda (Schöniger, 2020).

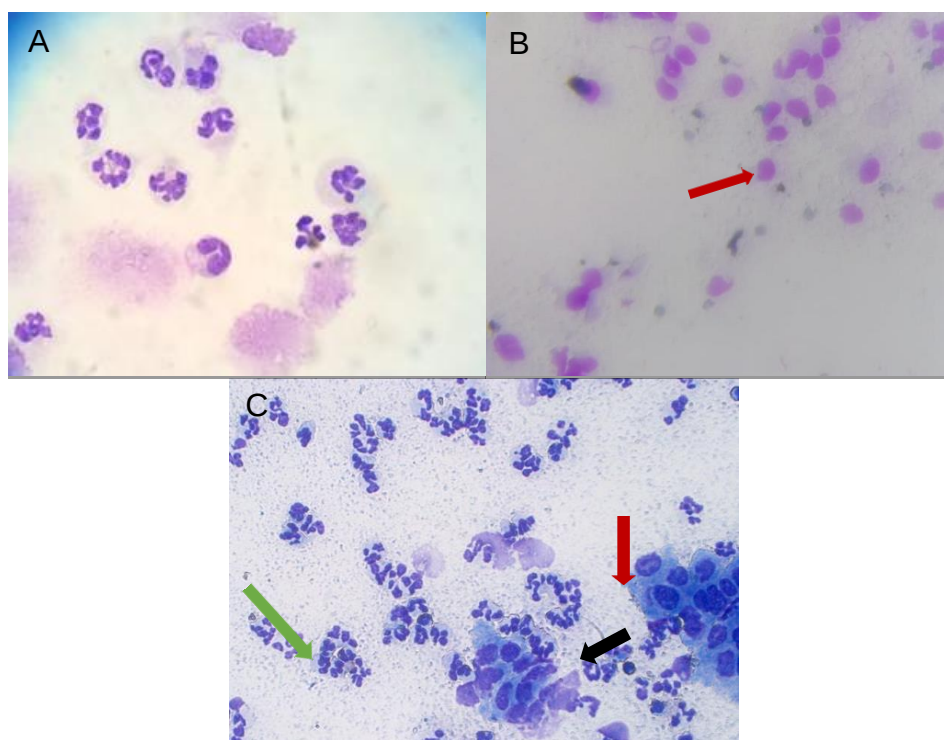


Figura 9. Citología de una muestra de LU (A) con presencia de PMNs. Citología endometrial por hisopado (B) sin presencia de PMNs; flecha roja: células epiteliales. Citología con presencia de PMNs (flecha verde) en yegua con EPPS; flecha negra: espermatozoide. Fuente: cortesía de la Dra. María Eugenia Cadario.

Si bien aún no existe una escala estándar de interpretación de las muestras para citología endometrial, y sí muchas propuestas, lo concreto es que varían dependiendo del método de muestreo, es decir no hay una interpretación “universal” sino varias particulares por lo que es muy importante que el clínico esté familiarizado con ellas, idealmente para que él mismo haga la interpretación o, si no lo hace, saber qué escala utiliza su laboratorio de referencia (y por qué). Para categorizar el grado de inflamación mediante citología, los resultados se expresan como el número de PMN en 10 campos a 400X o como un porcentaje de PMN sobre un total de 100 o 200 células endometriales. Debe considerarse que, debido a las diferentes sensibilidades asociadas con el hisopo, el cepillo, el lavado y la biopsia, se deben tener diferentes niveles de umbral en citología (Tabla 1). Recomendamos la revisión de Ryan Ferris (2015) sobre la interpretación de citologías endometriales.

Tabla 1. Comparación de recuento de PMN para detectar endometritis según distintos métodos de muestreo.

Citología	Recuento PMN	Referencia
Hisopo	2% PMN	Katila, 2016
	≥1-2 PMN/10 campos	Ferris, 2015
Cepillo	1% PMN	Katila, 2016
	0,5 % PMN	LeBlanc, 2010
Lavaje	≥3 PMN/5 campos	Katila, 2016
	≥1 PMN/10 campos	LeBlanc, 2007
Biopsia	1% PMN	Buczkowska, 2014
	0,5% PMN	Nielsen, 2005

Los **cultivos**, para ser considerados positivos, deben estar respaldados por la presencia simultánea de PMN o efluentes turbios del LU, ya que los falsos positivos son frecuentes debido a la contaminación. Por otro lado, los PMN se encuentran en ausencia de bacterias en la endometritis subclínica. Los falsos negativos pueden deberse a una falla en la recuperación de los organismos presentes, generalmente debido al uso de métodos de baja sensibilidad.

Los estreptococos latentes metabólicamente inactivos (dentro del endometrio) son muy difíciles de detectar con cualquiera de los métodos convencionales. Por otro lado, también puede haber inflamación o irritación estéril por razones no infecciosas como en el caso de urómetra (Katila, 2016; Kelley, 2019). Aunque los hisopos fueron diseñados originalmente para muestras para bacteriología, tienen la sensibilidad más baja y el valor predictivo negativo más bajo de todos los métodos (Katila, 2016).

La técnica mostró una menor capacidad para encontrar PMN en comparación con la biopsia (Christoffersen, 2015). Las muestras de biopsias uterinas poseen el mejor valor diagnóstico.

Los valores de sensibilidad y especificidad para citología y cultivo según el método de muestreo, difieren según distintos autores (Tabla 2). Los problemas metodológicos explican las diferencias entre los estudios en la prevalencia de la endometritis equina.

Tabla 2. Comparación de sensibilidad y especificidad de diferentes métodos de muestreo para citología y cultivo endometrial.

Método	Sensibilidad	Especificidad	Referencia
Citología con hisopo	0,09	0,95	Christoffersen, 2015
	0	0,93	Overbeck, 2011
Cultivo con hisopo	0,34	1	Nielsen, 2005
	0,33	0,83	Overbeck, 2011
Citología con cepillo	0,71	0,85	Buczkowska, 2014
	0,17	0,83	Overbeck, 2011
Cultivo con cepillo	0,5	0,73	Buczkowska, 2014
	0,25	0,8	Overbeck, 2011
Citología con lavaje	0,8	0,67	LeBlanc, 2007
	0,08	0,95	Christoffersen, 2015
Cultivo con lavaje	0,71	0,86	LeBlanc, 2007
	0,75	0,72	Christoffersen, 2015
Citología con biopsia	0,77	1	Nielsen, 2005
	0,33	1	Christoffersen, 2015
Cultivo con biopsia	0,82	0,92	Nielsen, 2005
	0,5	0,9	Christoffersen, 2015

La **histopatología** de una muestra de biopsia endometrial se examina para detectar la presencia de cambios inflamatorios y/o degenerativos. La inflamación aguda se reconoce por la presencia de PMN en el estrato subepitelial (compacto), mientras que la inflamación crónica se caracteriza por la presencia de linfocitos y otras células mononucleares en general en estrato esponjoso del endometrio (Figura 10). Es el único método que nos permite identificar endometritis crónica o lesiones más profundas. A diferencia de la inflamación, la fibrosis representa una condición patológica permanente y su “tratamiento” con sustancias irritantes, curetaje, células madre mesenquimales y plasma rico en plaquetas es discutible y no hay resultados concluyentes repetibles (Scoggin, 2016).

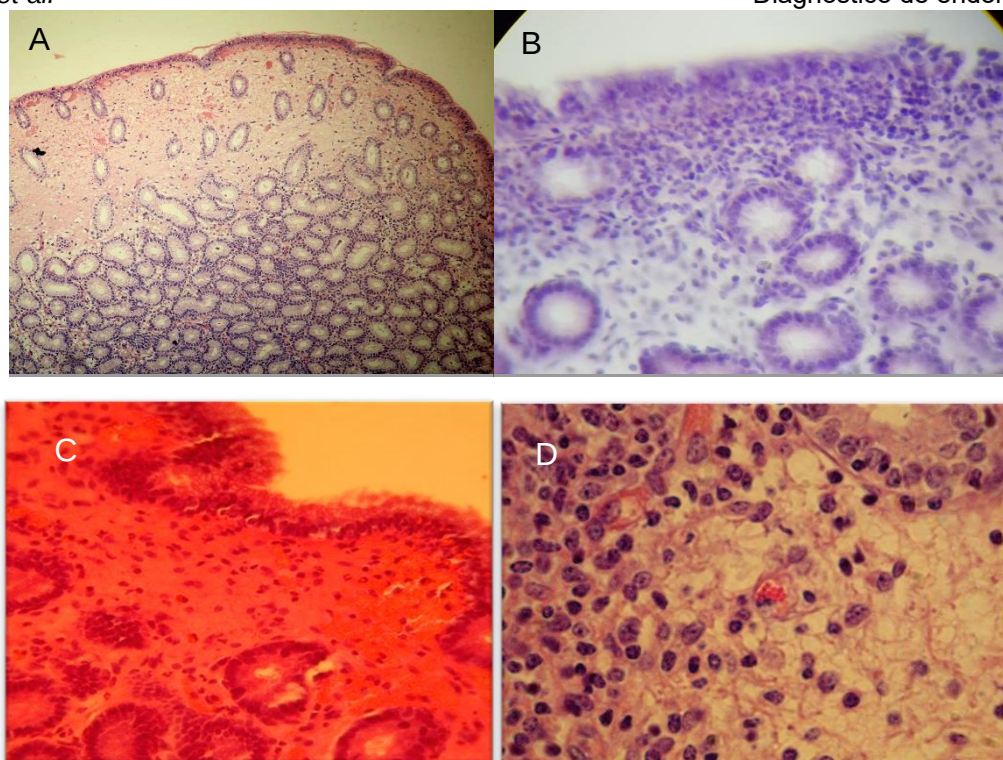


Figura 10. Cortes histológicos obtenidos por biopsia endometrial. A: endometrio normal en estró (con mucus); B y C: Reacción epitelial, hiperemia e infiltrado inflamatorio en estrato compacto (endometritis aguda); D: Infiltración en estrato esponjoso (PMN, mononucleares, eosinófilos), endometritis crónica profunda.

Microorganismos no detectables con la metodología básica estandarizada

La respuesta inflamatoria uterina puede variar según los diferentes microorganismos, no todos producen una respuesta leucocitaria similar y fluido IU. A su vez, la inflamación detectada por la citología puede ser causada por un patógeno que no crece en un medio de cultivo convencional.

Los microorganismos reportados con mayor frecuencia en la bibliografía son *Escherichia coli* y *Streptococcus equi* var zooepidemicus β -hemolítico (Diel de Amorim, 2015). *E. coli* está menos asociada con la presencia de PMN en el examen citológico que otras bacterias y también con menor (o nula) respuesta de fluido intrauterino.

Se sugiere que esta capacidad de prevenir la activación de la respuesta inmune, se deba posiblemente a que *E. coli* no es tan quimiotáctica para los PMN en el endometrio como otras bacterias o levaduras (Nielsen, 2010). Por lo tanto, a menudo existen discrepancias entre los resultados del examen clínico, citológico y bacteriológico en el sentido que “la clínica” (en general de baja sensibilidad y especificidad como para establecer diagnósticos categóricos) no se correlaciona con los resultados del laboratorio, algo por lo demás, bastante frecuente.

Si bien *E. coli* es la especie más prevalente aislada mediante el LU (LeBlanc, 2007) en algunos reportes, una biopsia endometrial no sólo toma una muestra de la superficie, sino también de las capas endometriales más profundas, por lo que es más sensible para detectarla (Nielsen, 2005). Esto probablemente refleje la localización bacteriana más frecuente, con *E. coli* localizada en el epitelio luminal y *S. zooepidemicus* dentro o debajo del epitelio luminal en una

Chapero *et al.*

Diagnóstico de endometritis [...]

distribución multi-focal (Petersen, 2015). En algunas yeguas se ha identificado *S. zooepidemicus* latente en lo profundo de las glándulas uterinas (Ferris, 2017). Las bacterias que residen más profundamente en el endometrio no se recuperan mediante técnicas de muestreo superficiales. *S. zooepidemicus* se asocia generalmente con citología positiva y con la presencia de líquido intrauterino detectado por ecografía (Silva Rua, 2018).

La sospecha de infección, a pesar de las repetidas pruebas de diagnóstico negativas, muchas veces puede impulsar el tratamiento empírico con antibióticos en este grupo de yeguas problemáticas, pero tendrá poco o ningún efecto sobre estas poblaciones bacterianas debido a su estado metabólicamente inactivo, lo que las hace tolerar incluso niveles muy altos de antibióticos. La presencia de estreptococos latentes en el endometrio hará que la yegua se infecte de forma recurrente, en general con presentaciones clínicas posteriores a algún estímulo (lavajes para obtención de embriones, servicio, IA). A su vez, los estreptococos se distribuyen localmente, lo que dificulta su recuperación sin activación, incluso cuando se toman biopsias. Estas bacterias latentes (*dormant*) pueden ser “activadas” nuevamente luego de la infusión de un medio de cultivo especializado (bActivate®), lo que permite diagnósticos posteriores de endometritis latentes subclínicas en hasta 64% de los casos (Petersen, 2015).

Algunas bacterias se adhieren firmemente al epitelio y son más difíciles de eliminar al recolectar muestras para el cultivo en especial cuando hay una fuerte producción de mucus por parte de las células epiteliales, y otras pueden crear un biofilm, lo que perjudica la detección e identificación de bacterias durante el análisis del cultivo. La mayoría de las cepas de *Streptococcus equi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* tienen la capacidad de producir biofilms *in vitro* e *in vivo* (Ferris, 2015).

Se ha sugerido que el biofilm desempeña un papel importante en los casos de endometritis infecciosa crónica, debido a que permite que la infección persista por más tiempo al ofrecer protección *in vivo* contra el sistema inmune innato y los tratamientos médicos tradicionales. Sería ideal tener un marcador de diagnóstico para determinar si los casos de endometritis infecciosa involucran un biofilm, pero hasta el momento no se cuenta con métodos que permitan diagnosticar eficientemente la presencia de biofilm en medicina humana o veterinaria. Sin embargo, hay reportes de estudios avanzados con el uso de fluorocromos en marcha (Ferris, 2017) que permiten visualizarlos utilizando histeroscopia (los superficiales) y también en biopsias endometriales. Recientemente (Gallacher *et al*, 2018), se ha reportado el uso de endomicroscopia confocal laser (CLE) en el útero de la yegua, para detectar imágenes celulares en tiempo real con resolución de una micra utilizando fibra óptica, lo que abre un promisorio campo de investigación y clínico.

El diagnóstico de endometritis producida por hongos se basa en la citología endometrial, el cultivo uterino o la biopsia uterina. Aproximadamente del 1% al 5% de los hisopados uterinos enviados a un laboratorio de diagnóstico son positivos para el crecimiento de hongos (Dascanio, 2001). Pueden cultivarse inicialmente en agar sangre, y luego en agar Sabouraud (medio enriquecido para hongos). El tiempo para su crecimiento es sensiblemente superior al de las bacterias y el laboratorio debe ser consciente de que se solicita una búsqueda de organismos fúngicos. De lo contrario, después del tiempo de observación habitual para el crecimiento microbiano, el cultivo podría considerarse negativo, debido a la notificación temprana de los resultados. La endometritis fúngica equina suele ir acompañada de bacterias, siendo los más frecuentes *Streptococcus equi* var *zooepidemicus* β -hemolítico y *E. coli* (Dascanio, 2014). En estos casos, después del tratamiento con medicamentos antimicóticos, suele desarrollarse una endometritis bacteriana y persiste la infertilidad.

Nuevos métodos de diagnóstico

Los cultivos tradicionales no siempre detectan organismos bacterianos o fúngicos presentes en una yegua con endometritis infecciosa. Los problemas incluyen la presencia de organismos de crecimiento lento, infecciones profundas, biofilms y la dificultad de cultivar organismos anaerobios.

Las pruebas de diagnóstico molecular, como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), están comenzando a reemplazar al cultivo tradicional de bacterias y hongos en la medicina humana y veterinaria (Ferris, 2013; Weber, 2019). Un estudio realizado por Ferris *et al* (2017) logró identificar exitosamente microorganismos con métodos como MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight) que detecta proteínas bacterianas, cultivos en agar cromogénico (para gram positivos y negativos), BBL Crystal™ Identification System (para gram positivos) y BioMérieux API® Identification Strip (para gram negativos).

Estas técnicas se utilizan cuando se requiere una identificación rápida o los organismos son difíciles de cultivar. Las ventajas de los ensayos de PCR para los veterinarios, incluyen el análisis rápido de una muestra y la capacidad potencial para detectar la presencia de ADN microbiano en casos de endometritis infecciosa donde el cultivo tradicional no tuvo éxito.

Este análisis, lleva un tiempo aproximado de 6 horas, con secuenciación y reporte final del agente causal aproximadamente 24-48 horas después (Dascanio y McCue, 2014). En medicina humana, se utiliza una plataforma que permite que la amplificación y detección del ADN ocurra en 1 a 2 horas (Ferris, 2016). La detección temprana de una infección permitirá a los veterinarios tomar decisiones con respecto al tratamiento días antes de que los resultados del cultivo tradicional estén disponibles. Una de las limitaciones de esta técnica es que la prueba de sensibilidad a los antibióticos no está disponible con los resultados.

La contaminación del ADN es una de las causas de un diagnóstico falso positivo cuando se utiliza un ensayo molecular. Se debe tener precaución al interpretar los resultados de los ensayos de PCR, ya que a menudo son extremadamente sensibles y pueden detectar ADN de organismos muertos y pueden no coincidir con el cuadro clínico de un caso. En el futuro, el marcador de ARN y ADN podría usarse como ayuda de diagnóstico además del examen ginecológico y los métodos de diagnóstico de laboratorio de rutina (Nielsen, 2019).

Conclusiones

Podemos concluir que todavía y a pesar de más de 50 años de estudio y experimentación, no existe un método ideal para tomar muestras del endometrio y diagnosticar la endometritis con alto grado de certeza en yeguas. La detección de endometritis infecciosa, aunque es difícil en ciertos casos, generalmente se puede diagnosticar o descartar fácilmente con una muestra de un hisopo, cepillo, LU o biopsia uterina. Estas muestras se envían habitualmente para cultivo microbiano y evaluación citológica. Sin embargo, no hay un análisis de la muestra que sea rápido de realizar, tenga una alta sensibilidad y especificidad, sea económico y arroje resultados rápidos.

El método de muestreo que se encuentra más fácilmente al alcance de los veterinarios es el hisopado, aunque deberían considerarse las otras opciones como cepillo, LU o biopsia para

RESEÑA

Chapero *et al.*

Diagnóstico de endometritis [...]

aquellas yeguas que nos resultan difíciles de diagnosticar. Cuando con el hisopado encontramos resultados de cultivo y citología que se correlacionan, puede ser un buen método de muestreo. Pero cuando no, debemos evitar caer en el error de diagnosticar un individuo como sano cuando en realidad está enfermo, y aquí es donde entran en juego los demás métodos de muestreo y de diagnóstico. Se debe tener presente también que hoy en día el diagnóstico por PCR es una herramienta que comienza a estar a nuestro alcance, y que nos permitirá un diagnóstico en pocas horas.

Bibliografía

Ball BA, Hillman RB, Woods GL (1987). Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. *Theriogenology* 28(2):167-74. DOI: 10.1016/0093-691(87)90264-0

Beehan DP, Wolfsdorf K, Elam J, Krekeler N, Paccamonti D, Lyle SL. (2015). The evaluation of biofilm forming potential of *Escherichia coli* collected from the equine female reproductive tract. *Journal of Equine Veterinary Science* 35 (11–12)pages 935-939

Buczkowska J, Kozdrowski R, Nowak M, Raś A, Staroniewicz Z, Siemieniuch M. (2014). Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reproductive Biology and Endocrinology* (2014) 12(1)

Canisso IF, Segabinazzi LGTM, Fedorka CE. (2020). Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares- a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1432.

Christoffersen M, Brandis L, Samuelsson J, Bojesen AM, Troedsson MHT, Petersen MR. (2015). Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. *Theriogenology* Vol 83 222-227

Dascanio J, Schweizer C, Ley W. (2001). Equine fungal endometritis. *Equine Veterinary Education* 13(6) 324-329

Dascanio J, McCue P. (2014). *Equine reproductive procedures*. ISBN 978-0-470-96039-4

Diel de Amorim M, Gartley CJ, Foster RA, Hill A, Scholtz EL, Hayes A, Chenier TS. (2015). Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low volume lavage, and uterine biopsy, and combinations in the diagnosis of equine endometritis. *Journal of Equine, Veterinary Science* <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.10.012>

Doig PA, McKnight JD, Miller RB. (1981). The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can Vet J* 22(3):72-6.

Ferris RA, Bohn A, McCue PM. (2015). Equine endometrial cytology: collection techniques and interpretation. *Equine Veterinary Education*. <https://doi.org/10.1111/eve.12280>

Ferris RA. (2016). Diagnostic tools for infectious endometritis, *Vet Clin Equine* 32 481–498;<https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.08.001>

Chapero *et al.*

Diagnóstico de endometritis [...]

Ferris RA. (2017). Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*v.41, n.1, p.74-80.

Ferris RA, Palmer BA, Borlee BR, McCue PM. (2017). Ability of chromogenic agar, MALDI-TOF, API 20E and 20 strep strips, and BBL crystal enteric and Gram-positive identification kits to precisely identify common equine uterine pathogens. *Journal of Equine Veterinary Science* Vol 57 35-40

Gallacher K, Woolford L, Santos LC, Kind KL. (2018). Real-time in vivo microscopic imaging of equine endometrium using confocal laser endomicroscopy: preliminary observations and feasibility study. *Journal of Equine Veterinary Science* Vol 66 106-107

Hecker C, Hospes R. (2006). Endometrial biopsy in the mare - "Blind" Sampling of tissue or under hysteroscopic control? *Pferdeheilkunde* 22:140–4.

Katila T. (2016). Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reproductive Biology* <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2016.06.002>

Kelley DE, Schnobrich MR, Gayer S, Scoggin C, Bradcamp E, Canisso IF. (2019). Leukocyte esterase reagent strips for stall-side diagnosis of endometritis in mares. *Journal of Equine Veterinary Science* Vol 81 102672

Kenney RM, Doig PA. (1986). *Equine endometrial biopsy Current therapy in theriogenology* 2. third ed. Philadelphia: Saunders, W B; 1986. p. 723e83.

Knudsen O. (1964). Endometrial cytology as a diagnostic aid in mares. *Cornell Vet.* Jul;54:415-22.

LeBlanc M, Riddle W, Stromberg A. (2007). Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology* 68(3) 395-402

LeBlanc M. (2010). Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *RepDom Anim* 45 21-27

Liu IKM, Troedsson MHT. (2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology* 70 415–420

Nielsen JM. (2005). Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology* 64 510–518

Nielsen JM, Troedsson MH, Pedersen MR, Bojesen AM, Lehn-Jensen H, Zent. (2010). Diagnosis of endometritis in the mare based on bacteriological and cytological examinations of the endometrium: comparison of results obtained by swabs and biopsies. *Journal of Equine Veterinary Science* <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2009.11.006>

Nielsen JM. (2019). Characteristics of equine endometrial *Streptococcus* infections. 11th International Conference on Equine Reproductive Medicine

Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W. (2014). Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology* Vol 75 1311-1318

Chapero *et al.* Diagnóstico de endometritis [...] Petersen MR, Skive B, Christoffersen M, Lud K, Nielsen JM, Troedsson MH, Bojesen AM. (2015). Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in mares with subclinical endometritis. *Veterinary Microbiology* 179 119–125; <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.06.006>

Pothmann H, Müller J, Pothmann I, Tichy A, Drillich M. (2019). Reproducibility of endometrial cytology using cytobrush technique and agreement for the diagnosis of subclinical endometritis between five predefined endometrial sites. *Reproduction in Domestic Animals* 54(2) 350-357

Scoggin CF. (2015). Not just a number: effect of age on fertility, pregnancy and offspring vigour in thoroughbred brood-mares. *Reproduction, Fertility and Development* 27(6) 872-879 <https://doi.org/10.1071/RD14390>

Scoggin CF. (2016). Endometritis: nontraditional therapies. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* Vol 32 499-511

Schöniger S, Schoon HA. (2020). The Healthy and Diseased Equine Endometrium: A Review of Morphological Features and Molecular Analyses. *Animals* 10, 625; <https://doi.org/10.3390/ani10040625>

Silva Rua MA, Quirino CR, Bittencourt Ribeiro R, Queiroz Carvalho EC, Amaral Bernadino ML, Bartholazzi A, Cipagalta LF, Pessanha Barreto MA. (2018). Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares. *Theriogenology* 114 285e292

Tuppits U, Orro T, Einarsson S, Kask K, Kavak A. (2014). Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen–thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. *Animal Reproduction Science* Vol 146, Issues 3–4, Pages 182-186

Troedsson MHT. (2006). Breeding-induced endometritis in mares. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 22(3):705-12

Troedsson MHT, Woodward EM. (2016). Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. *Reproductive Biology* 16, 8-12; <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2016.01.003>

Weber K, Wagener K, Blanco M, Stevens M, Bauersachs S, Bollwein H. (2019). Diagnosis of subfertile mares - does the use of molecular biological methods make sense? 11th International Conference on Equine Reproductive Medicine.