

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Julia Brum Spreckelsen Casarin

**ANÁLISE BACTERIOLÓGICA, CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA
DO TRATO REPRODUTIVO DE VACAS DE ABATE**

Santa Maria, RS
2016

Julia Brum Spreckelsen Casarin

**ANÁLISE BACTERIOLÓGICA, CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO TRATO
REPRODUTIVO DE VACAS DE ABATE**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Mara Iolanda Batistella Rubin
Co-orientador: Dr. Severo Sales de Barros

Santa Maria, RS
2016

Julia Brum Spreckelsen Casarin

**ANÁLISE BACTERIOLÓGICA, CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO TRATO
REPRODUTIVO DE VACAS DE ABATE**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 29 de julho de 2016:



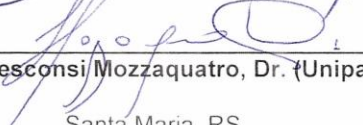
Mara Iolanda Batistella Rubin, D^{ra} (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Severo Sales de Barros, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)



Cláudio Severo Lombardo de Barros, Dr. (UFSM)



Fabrício Desconsi Mozzaquatro, Dr. (Unipampa)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dr.^a Mara Iolanda Batistella Rubin pela oportunidade, incentivo e orientação na elaboração deste trabalho e por exigir de mim muito mais do que eu supunha ser capaz de fazer. Muito obrigada!

Ao Dr. Severo Sales de Barros quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência e minha gratidão pelo apoio e confiança.

Ao meu filho João Arthur pela compreensão nos momentos que me fiz ausente e que de forma carinhosa me deu força e coragem.

A minha mãe Isabel pelo amor e apoio, que não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu namorado Ricardo pela paciência e compreensão.

Aos membros da equipe do Embryolab pelo convívio, suporte, compreensão e pela amizade.

RESUMO

ANÁLISE BACTERIOLÓGICA, CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DO TRATO REPRODUTIVO DE VACAS DE ABATE

AUTORA: Julia Brum Spreckelsen Casarin
ORIENTADORA: Mara Iolanda Batistella Rubin

Doenças reprodutivas causam altas perdas econômicas nos rebanhos bovinos, sendo a endometrite uma das alterações mais relevantes. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar a associação dos achados fisiopatológicos em exames macroscópicos, bacteriológicos, citológicos e histopatológicos nas porções do trato genital de 23 vacas abatidas, bem como avaliar a necessidade de associação destes exames para efetuar diagnóstico fidedigno. A avaliação macroscópica da secreção, os exames histopatológico, citológico e as bactérias identificadas foram correlacionados. Não houve associação ($P>0,05$) dos resultados nas diferentes porções do trato genital. Na vagina foram isoladas as bactérias *Trueperella pyogenes* e *Escherichia coli*. Na cérvix, em apenas 2/23 (8,6%) amostras isolou-se *Enterococcus faecalis* e gram negativo oxidase positiva. No útero houve isolamento apenas da bactéria *Staphylococcus epidermidis*. As amostras histopatológicas classificadas em grupo II e III não apresentaram alterações detectadas no exame macroscópico. As amostras com secreção não fisiológica na vagina e cérvix não apresentaram alterações nos outros exames na porção uterina. A amostra com cultura bacteriológica positiva no útero demonstrou uma infecção ascendente através da alta contagem de granulócitos nas três porções analisadas. O presente estudo reforça o conceito de que a vaginite e cervicite diagnosticadas pelo exame clínico na vaca não retratam o real status da saúde uterina e por esta razão, o tratamento do útero deve ser conduzido com critério, alicerçado nos exames complementares para definir a terapia adequada para cada situação.

Palavras-chave: Endométrio. Granulócitos. Bactérias. Bovinos.

ABSTRACT

BACTERIOLOGICAL, CYTOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL EXAMINATION OF THE REPRODUCTIVE TRACT OF SLAUGHTERED COWS

AUTHOR: Julia Brum Spreckelsen Casarin
ADVISOR: Mara Iolanda Batistella Rubin

Reproductive diseases, mainly endometritis, are important hurdles in cattle raising, In the current study we evaluated gross, bacteriological, cytological, and histological findings from selected sites of the genital from 23 slaughtered cows and tested whether there is an association between these findings and the probability of reaching a reliable diagnosis. The results from the examinations of macroscopic aspects of uterine secretions, the cytological, bacteriological, and histopathological findings were then correlated. There was no significant correlation ($P>0.05$) of the statistical data from different parts of the genital tract. *Trueperella pyogenes* and *Escherichia coli* were isolated from the vagina in 3/23 cases. In only 2/23 samples *Enterococcus faecalis* and a gram-negative, oxidase-positive bacteria were isolated from the cervix uteri. Only *Staphylococcus epidermidis*, in 1/23 case, was isolated from the uterus. Histopathological findings in uterus from samples of Groups II (moderate lesions) and III (severe lesions) did not translated in grossly visible changes. Samples from reproductive tracts with secretion in the vagina and cervix uteri had no detectable changes in the other parameters analyzed from this portion. Uterus with positive bacterial culture had evidence of ascendant inflammation judging by the high granulocyte count in the three analyzed portions. This study reinforces that vaginitis and cervicitis in the cow diagnosed only by clinical examination does not reflect the real status of the uterine health. For this reason, treatment of uterine disorders should be conducted based on reliable tests to determine the appropriate therapy for each situation.

Keywords: Endometrium. Polymorphonuclear. Bacteria. Bovine.

LISTA DE TABELAS

Table 1 – Classification of histological findings in the 23 reproductive tracts collect from slaughtered cows	Erro! Indicador não definido.
Table 2 - Data on the evaluation of the different portions of the reproductive tract of 23 slaughtered cows	28
Table 3 - Relationship of the histopathology (Groups I and III) with gross characteristic of uterine secretion, granulocytes per 100 cells and bacteriological culture, and relationship of the proportion granulocytes per 100 cells, granulocytes per 100 cells with gross aspect of the secretion sampled from the lumen of the cervix uteri, vagina and uterus from 23 slaughtered cows.....	29

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	PROBLEMÁTICA DAS PATOLOGIAS REPRODUTIVAS	11
2.2	ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO.....	11
2.3	ALTERAÇÕES DO TRATO REPRODUTIVO	12
2.4	INCIDÊNCIA DA METRITE E ENDOMETRITE NO REBANHO	14
2.5	AGENTES COMUMENTE ENCONTRADOS EM INFECÇÕES UTERINAS	14
2.6	DIAGNÓSTICO.....	16
3.	CAPÍTULO I - TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	19
	INTRODUCTION.....	21
	MATERIAL AND METHODS.....	21
	RESULTS	22
	DISCUSSION.....	22
	REFERÊNCIAS	30

1. INTRODUÇÃO

A rentabilidade da bovinocultura está intimamente associada à saúde reprodutiva dos animais e as infecções uterinas frequentemente causam aumento do intervalo entre partos, repetição de cios, redução na taxa de concepção e infertilidade, ocasionando prejuízos ligados ao custo de tratamento, perda produtiva e descarte dos animais. Em geral, a contaminação do ambiente uterino ocorre durante o parto, o que pode culminar na instalação de infecção puerperal. As infecções uterinas no período pós-parto frequentemente causam aumento do intervalo entre partos, repetição de cios, redução na taxa de concepção e infertilidade.

Os estudos sobre a saúde uterina datam desde a década de 60 e as bactérias patogênicas já foram identificadas. *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* são consideradas as causas bacterianas primárias de doenças uterinas. No entanto, outras bactérias como *Bacterioides spp*, *Ureaplasma spp*, *Staphylococcus spp*, *Helcococcus spp*, *Prevotella melaninogenicus* e *Streptococcus spp* também têm sido associadas com doenças uterinas (MACHADO et al., 2012).

Segundo LeBlanc et al. (2002), a presença de bactérias no útero provoca inflamação, lesões histológicas no endométrio e atraso na involução uterina, levando a metrite, ou a endometrite crônica. A gravidade da inflamação é dependente, em parte, do tipo das bactérias presentes, embora o estabelecimento e a persistência da infecção também são influenciados pela eficiente resposta inata, imunidade adquirida, fatores genéticos e útero saudável.

Para análise da morfologia endometrial, a biópsia uterina é ideal, pois uma amostra do endométrio é representativa de toda a mucosa (BONNETT et al., 1991). Quando o útero é infectado, células inflamatórias invadem o endométrio. Nesta situação observa-se necrose local, hiperemia, congestão, com elevação no número de células no tecido, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, com presença de glândulas uterinas apresentando dilatação cística ou atrofia e com fibrose periglandular, quadro relacionado com efeito deletério no desempenho reprodutivo (CORDEIRO et al., 1989b).

O diagnóstico das doenças uterinas se baseia no exame clínico geral e específico, com exames complementares de citologia uterina, através da contagem

das células inflamatórias (CORDEIRO et al., 1989a) coletadas por esfregaço do lúmen uterino e histopatológico das biópsias uterinas (CORDEIRO et al., 1989b). A campo, o diagnóstico da endometrite baseia-se na presença de secreção purulenta no muco vaginal e a gravidade da enfermidade é mensurada associando-se a data do parto e eventos agravantes, como distocias, retenção de placenta, natimorto, com alterações sistêmicas no animal, tais como aumento da temperatura e as características da secreção (coloração e odor).

Ao se efetuar o exame clínico geral e específico do trato reprodutivo da vaca espera-se que as alterações reprodutivas identificadas ao exame macroscópico estejam em concordância com os exames laboratoriais. Nossa hipótese fundamenta-se na obrigatoriedade de contaminação bacteriana no útero quando o diagnóstico do exame clínico aponta sinais de inflamação na vagina e/ou cérvix.

Este estudo teve como objetivo analisar a associação dos achados fisiopatológicos em exames macroscópicos, bacteriológicos, citológicos e histopatológicos para estabelecer um diagnóstico preciso das alterações encontradas nas diferentes porções do trato genital feminino bovino.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROBLEMÁTICA DAS PATOLOGIAS REPRODUTIVAS

O trato reprodutivo saudável é essencial para um desempenho reprodutivo satisfatório. Com o passar das décadas a capacidade produtiva das vacas aumentou marcadamente. O impacto deste aumento foi uma redução na fertilidade destes animais, refletida pelo aumento de dias abertos, maior número de serviços por concepção e maior incidência de problemas reprodutivos resultando em descarte dos animais (DHALIWAL et al., 1996). Doenças uterinas são conhecidas por causarem altas perdas econômicas devido à queda na produção de leite, menores taxas de concepção, aumento do intervalo entre parto concepção ou primeiro serviço, aumento no intervalo entre partos e aumento no descarte de vacas por falhas reprodutivas (HUSZENICZA et al., 1999; LEBLANC et al., 2002; SHELDON et al., 2009).

Vacas diagnosticadas com endometrite clínica entre 20 e 33 dias pós-parto tiveram 1,7 vezes mais probabilidade de serem abatidas do que vacas sem endometrite (LEBLANC et al., 2002). Gilbert et al. (2005) detectaram que vacas diagnosticadas com endometrite apresentaram 206 dias em aberto, enquanto que os animais livres desta condição o valor foi de 118 dias. Animais com metrite pós-parto tiveram aumento no tempo da primeira inseminação em 7,2 dias, a taxa de concepção para primeira inseminação reduziu em 20%, resultando em mais de 19 dias para a concepção e o intervalo entre parto concepção aumentou em 18,6 dias (FOURICHON et al., 2000).

2.2 ESTABELECIMENTO DA INFECÇÃO

A inflamação é uma reação celular desencadeada por estímulos nocivos, incluindo a infecção e lesão de tecidos, que evolui como uma resposta adaptativa para restaurar a homeostase nas células e tecidos de organismos simples (MEDZHITOV, 2008).

Os sistemas de inflamação e imunidade inata evoluíram com a fisiologia reprodutiva. Diversos mediadores servem como sinalizadores do processo inflamatório, dirigindo a resposta por atração e ativação de células imunes,

particularmente neutrófilos e macrófagos para remover agentes patogênicos e células hospedeiras danificadas. A inflamação também faz parte da manutenção da homeostase do tecido durante as alterações fisiológicas na arquitetura dos órgãos durante a ovulação, ou o parto. No entanto, a imunidade inata é vital para proteger o trato reprodutor feminino dos efeitos adversos de infecções microbianas. Estas infecções são particularmente importantes em bovinos, onde bactérias e vírus em muitos casos causam infertilidade (SHELDON et al., 2014).

Após o parto, o revestimento uterino se desprende e deve ser regenerado (SHELDON et al., 2009). Neste período as bactérias podem invadir a cavidade uterina via ascendente através do canal do parto (SHELDON & DOBSON, 2004). As barreiras anatômicas como vulva, vagina e cérvix retêm as infecções microbianas ascendentes que podem alcançar o útero. Outras barreiras físicas no trato genital incluem o epitélio escamoso estratificado da vagina, o epitélio colunar do endométrio, a membrana basal dos folículos ovarianos e a zona pelúcida do oócito (SHELDON et al., 2014). No entanto, as bactérias patogênicas podem superar a defesa imune inata, bem como a gravidade e duração da inflamação podem comprometer a fertilidade (LEBLANC, 2015).

O estabelecimento da infecção tem como resultado a aderência de organismos patogênicos na mucosa, colonização e penetração no epitélio e/ou liberação de toxinas bacterianas que levam ao estabelecimento da doença uterina (JANEWAY et al., 2001). A ocorrência de metrite está associada a inúmeros fatores. Williams et al. (2007) afirmam que a contaminação bacteriana intrauterina é proveniente do ambiente ao qual a vaca é exposta após o parto, da pele e das fezes do próprio animal e das camas.

Décadas se passaram e os problemas no parto como distocia, natimorto e parto gemelar continuam sendo os fatores que aumentam o risco de doenças uterinas (MARKUSFELD, 1984; GIULIODORI et al., 2013). Potter et al (2010) relataram que vacas primíparas têm maior probabilidade de sofrer danos uterinos quando comparadas a vacas múltiparas. Esta mesma equipe também observou que a angulação da vulva predispõe à contaminação do lúmen uterino.

2.3 ALTERAÇÕES DO TRATO REPRODUTIVO

As definições de metrite e endometrite propostas por Radostis et al. (2002) ditam que metrites são alterações inflamatórias que envolvem o endométrio, os tecidos glandulares e as camadas musculares. Já as endometrites envolvem apenas o endométrio, sendo um processo inflamatório superficial do endométrio, que não atinge camada mais profunda que o estrato esponjoso do tecido.

A metrite é caracterizada por útero aumentado, secreção uterina fétida, aquosa, de coloração vermelho-acastanhada (DRILLICH et al., 2001) que ocorre geralmente dentro de 21 dias após o parto, com pico de incidência dentro da primeira semana pós-parto (LEBLANC et al., 2002). Quando a metrite está associada com sinais de doença sistêmica (diminuição da produção de leite, apatia, ou outros sinais de toxemia) e temperatura $> 39,5^{\circ}\text{C}$ é chamada metrite puerperal.

A endometrite é definida como a inflamação do endométrio e eliminação de catarro genital purulento 21 dias pós-parto, sem sinais de doença sistêmica ou eliminação de catarro genital de aspecto muco-purulento após os 26 dias pós-parto, que pode ser considerada o estágio de inflamação crônica uterina (SHELDON et al., 2006). Histologicamente, segundo Kennedy et al. (1993) a endometrite é caracterizada por dano epitelial, infiltração de células inflamatórias, congestão vascular, edema e por variados graus de acúmulo de linfócitos e plasmócitos nas camadas superficiais do tecido.

A endometrite é classificada como clínica ou subclínica. A endometrite clínica caracteriza-se pela presença de exsudatos uterinos purulentos ($> 50\%$ de pus) ou mucopurulentos (aproximadamente 50% de pus, 50% de muco) detectáveis na vagina 21 dias pós-parto (SHELDON et al., 2006). A endometrite subclínica foi definida por Kasimanickam et al. (2004) quando há presença de $> 18\%$ de neutrófilos na citologia uterina, sendo as amostras coletadas 20-33 dias após o parto ou $> 10\%$ de neutrófilos em 34-47 dias pós-parto. Vacas com retenção de placenta, metrite, ou apenas febre sem sinais clínicos tem o dobro do risco de desenvolverem endometrite subclínica 30 dias pós-parto. No entanto, há redução gradativa na prevalência da endometrite subclínica conforme a lactação progride nos primeiros dois meses pós-parto. Nos casos de alterações inflamatórias leves ou localizadas, não foram observados sintomas clínicos. As secreções são totalmente reabsorvidas pela mucosa do aparelho genital (SANTOS et al., 2009). A endometrite subclínica passou a ser assim denominada por Dubuc et al. (2010) e Yasui et al. (2014) como a

inflamação do endométrio determinada pela citologia, independente da presença de endometrite clínica.

2.4 INCIDÊNCIA DA METRITE E ENDOMETRITE NO REBANHO

O estudo de Sheldon et al. (2009) revelou que até 40% dos animais apresentam metrite nas duas primeiras semanas após o parto e em 10 a 15% destes animais, a infecção persiste por pelo menos outras três semanas, causando endometrite. Andrade et al. (2005) avaliaram 1473 vacas e encontraram uma frequência de 17% de alterações inflamatórias do útero. Em cinco fazendas de vacas leiteiras os autores detectaram 53% dos rebanhos com endometrite citológica. Neste mesmo estudo, 22 vacas de uma universidade apresentaram 100% de prevalência de endometrite aos 2 dias pós-parto e 89%, 58% e 41% na 4, 6 e 8ª semanas pós-parto (GILBERT, 2005). Através da citologia, Barlund et al. (2008) identificaram 11,1% do rebanho (n=189) como positivo para endometrite.

Na América do Norte, a metrite puerperal afeta 10 a 20% de vacas enquanto que a incidência de endometrite é de aproximadamente 28%, variando 5,3-52,6% (DUBUC et al., 2010; CHEONG et al., 2012). No município de Pupiales situado na Colômbia, Timarán et al. (2014) encontrou incidência de 24,7% de endometrite subclínica identificada através de citologia em um rebanho leiteiro de 174 animais. Outro estudo com 400 vacas de 10 fazendas comerciais constatou que 27,3% e 21% das vacas apresentaram endometrite clínica e subclínica, respectivamente (PRUNNER et al., 2014). Moscuza et al. (2015) ao avaliar 829 vacas de corte da raça Angus detectando 38,9% de endometrite subclínica no rebanho, confirmando os índices relatados na literatura.

2.5 AGENTES COMUMENTE ENCONTRADOS EM INFECÇÕES UTERINAS

Sabe-se que quase em sua totalidade as vacas sofrerão contaminação bacteriana no útero após o parto (SANTOS & BICALHO, 2012). Dawson (1959) classificou esta contaminação como uma infecção inespecífica, sendo a colonização inicial de bactérias no útero desconhecida sem a possibilidade de especificar a bactéria que está causando os sinais de infecção. Estudos posteriores relataram que *Escherichia coli*, *Trueperella pyogenes* e *Fusobacterium necrophorum* são

consideradas as causas bacterianas primárias das alterações uterinas (MILLER et al., 2007; BICALHO et al., 2010). Outras bactérias patogênicas como *Bacterioides spp*, *Ureaplasma spp*, *Staphylococcus spp*, *Helcococcus spp*, *Prevotella melaninogenicus* e *Streptococcus spp* também foram associadas com inflamações no trato reprodutivo (BONDURANT, 1999). *Actinomyces*, *Lactobacilos*, *Bacilos*, *Pasteurella* e *Pseudomonas* foram encontradas em 39,5% das amostras. *Escherichia coli* e *Trueperella pyogenes* foram encontradas em 16,8% e 13% das amostras cultivadas. *Streptococcus spp* (31,3%), *Staphylococcus spp.* (20%), *Corynebacterium spp.* (16,5%) e *Bacillus spp.* (10,5%) também foram isolados (PRUNNER et al., 2014).

A *Escherichia coli* foi sugerida como sendo o principal agente patogênico iniciador da infecção uterina no pós-parto (STUDER & MORROW, 1978). Recentemente esta bactéria apresentou importância na contaminação durante a primeira semana pós-parto, especialmente durante os primeiros três dias após o parto, induzindo alterações com potencial para favorecer a infecção subsequente por outros patógenos (BICALHO et al., 2012).

Fusobacterium necrophorum é uma bactéria Gram-negativa que em sinergismo com *Trueperella pyogenes*, que é Gram-positiva, causa inúmeras infecções em bovinos como abscessos no fígado, mandíbula, casco e pulmões, podridão nos cascos, mastite de verão e difteria em bezerros (NAGARAJA et al., 2005), bem como infecções uterinas (BICALHO et al., 2012). A análise metagenômica da microbiota bacteriana do útero de vacas leiteiras ou com metrite pós-parto evidenciou *Fusobacterium necrophorum* como a bactéria mais prevalente em vacas com metrite e sua ausência em vacas com trato reprodutivo sadio (SANTOS et al., 2011).

Um habitante comum das vias respiratórias superiores, urogenital e gastrointestinal de muitas espécies animais foi identificado como *Trueperella pyogenes* está associado com *Bacterioides spp.* (BRETZLAFF, 1987), *Escherichia coli* (USMANI et al., 2001) e *Fusobacterium nechophorum* (BICALHO et al, 2012), frequentemente identificado em vacas com metrite e endometrite.

Numerosas bactérias foram detectadas no ambiente uterino causando infecção. Machado et al. (2012) observaram grande contaminação por *Ureaplasma spp*, *Helcococcus spp* no útero de vacas com endometrite clínica e a prevalência da *Prevotella melaninogenica* na sétima semana pós-parto em animais com este

diagnóstico. Quando o animal apresenta descarga vaginal com odor fétido, Williams et al. (2005) destacaram a prevalência de *Streptococcus spp* e *Mannheimia haemolytica*. Machado et al. (2012) encontraram *Staphylococcus spp* associado a danos uterinos na vaca (MACHADO et al., 2012).

2.6 DIAGNÓSTICO

O exame ginecológico tem como objetivos: comprovação ou exclusão de gestação; avaliação das fases do ciclo estral; determinação dos transtornos do ciclo estral e diagnóstico de anomalias e enfermidades do sistema genital das fêmeas. Este se faz através da elaboração de uma ficha clínica para os animais; anamnese; exame clínico geral e exame clínico específico, sendo realizado através de exame externo dos órgãos genitais femininos, exame interno dos órgãos genitais, através de palpação retal, exame vaginal e exames complementares (GRUNERT et al., 2005). A eficiência de diferentes técnicas durante a avaliação ginecológica para o diagnóstico das enfermidades do trato reprodutivo foi estudada por diversos autores (STUDER & MORROW, 1978; CORDEIRO et al., 1989a; CORDEIRO et al., 1989b; BONNET, et al., 1991; GRUNERT et al., 2005).

A presença de fluxo vaginal purulento, diagnosticado através do exame vaginal (STUDER & MORROW, 1978) foi associado com a densidade de bactérias presentes no útero (SHELDON et al., 2004). O exame vaginal permite a classificação da secreção genital e assim infere a intensidade do processo inflamatório e infeccioso instalado no trato genital feminino, conforme proposto por Grunert et al. (2005). Neste sistema, quando o exame vaginal revela um fluxo de muco turvo, com estrias de catarro, cérvix ligeiramente aberta com coloração rosada intensa e maior umidade na mucosa vaginal caracteriza-se por catarro genital de grau 1. Quando a exame vaginal revela uma secreção muco-purulenta, com mucosa cervical hiperêmica e abertura do óstio cervical, podendo haver prolapso do primeiro anel, caracteriza-se por catarro genital de grau 2, e quando no exame detecta-se um catarro genital de aspecto purulento, podendo apresentar odor fétido, aumento da umidade vaginal, cérvix pérvia, podendo haver prolapso dos anéis cervicais caracteriza-se por catarro genital de grau 3.

A importância da avaliação uterina e cervical para auxiliar na diferenciação de manifestações fisiológicas e patológicas foi relada por Wehrend et al. (2003) ao

examinarem vacas no período pré e pós-parto com auxílio de ultrassom. Polat et al. (2015) descreveram a ultrassonografia como método de diagnóstico preferido na reprodução animal, devido a sua natureza não invasiva. No referido estudo, as diferentes texturas detectadas na ultrassonografia tiveram associação positiva com os achados na citologia uterina.

A afirmativa de que a citologia é um método eficiente para a avaliação dos processos infecciosos uterinos na vaca foi citada por Cordeiro et al. (1989a) ao demonstrar que a citologia é um método eficiente para a avaliação dos processos infecciosos uterinos, ressaltando ainda que os neutrófilos são a principal linha de defesa do endométrio, resultando no aumento da população de polimorfonucleares (PMN - também denominados granulócitos) dentro do lúmen uterino (WATSON, 1990; BUTT et al., 1991).

Quando o útero é infectado, células inflamatórias invadem o endométrio. Nesta situação observa-se necrose local, hiperemia, congestão, com elevação no número de células no tecido, linfócitos, macrófagos e neutrófilos, com presença de glândulas uterinas apresentando dilatação cística ou atrofia e com fibrose periglandular, quadro relacionado com efeito deletério no desempenho reprodutivo (CORDEIRO et al., 1989b). Nesta pesquisa, os autores detectaram que não houve correlação entre o exame clínico e o histopatológico do endométrio de vacas leiteiras com catarro genital.

Barlund et al. (2008) detectaram que animais com > 8% PMN identificados na citologia uterina, tem 1,9 chances a mais de não estar prenhes aos 150 dias.

Um estudo posterior comprovou que somente se pode determinar relação entre o fluxo purulento e endometrite após realização de citologia uterina (DUBUC et al., 2010). Entretanto, o percentual de PMN para definir endometrite subclínica varia de acordo com o período pós-parto em que os animais se encontram. A prevalência de endometrite subclínica depende do ponto de corte do percentual de granulócitos utilizado para diagnóstico e do tempo decorrido entre a parição e avaliação da situação uterina (LEBLANC, 2008).

Para análise da morfologia endometrial, a biópsia uterina é ideal, pois uma amostra do endométrio é representativa de toda a mucosa (BONNETT et al., 1991).

Como já mencionado, na literatura não se identificou um estudo em que vagina, cérvix e útero tenham sido objeto de pesquisa em conjunto para identificar a

associação ou não, entre a avaliação macroscópica, bacteriológica, citológica (vagina, cérvix e útero) e histopatológica (útero) na vaca.

3. CAPÍTULO I

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

**Análise bacteriológica, citológica e histopatológica do trato reprodutivo de vacas de
abate**

Julia Brum Spreckelsen Casarin, Ana Paula Martini, Gilson Antônio Pessoa, Janislene
Mach Trentin, Mariani Farias Fiorenza, Severo Sales de Barros, Mara Iolanda Batistella
Rubin

Pesquisa Veterinária Brasileira

2016

Bacteriological, cytological and histopathological evaluation of the reproductive tract of slaughtered cows ¹

Julia B.S. Casarin^{2*}, Ana P. Martini ², Janislene M. Trentin ³, Mariani F. Fiorenza ³, Gilson A. Pessoa ², Severo S. Barros ², Mara I.B. Rubin ²

ABSTRACT:- Casarin J.B.S., Martini A.P., Trentin J.M., Fiorenza M.F., Pessoa G.A., Barros S.S., Rubin M.I.B., 2016. [Bacteriological, cytological and histopathological evaluation of the reproductive tract of slaughtered cows] *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Departamento de Medicina de Grande Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 100, Camobi, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: juliaspreckelsen@gmail.com

Reproductive diseases, mainly endometritis, are important hurdles in cattle raising. In the current study we evaluated gross, bacteriological, cytological, and histological findings from selected sites of the genital from 23 slaughtered cows and tested whether there is an association between these findings and the probability of reaching a reliable diagnosis. The results from the examinations of macroscopic aspects of uterine secretions, the cytological, bacteriological, and histopathological findings were then correlated. There was no significant correlation ($P>0.05$) of the statistical data from different parts of the genital tract. *Trueperella pyogenes* and *Escherichia coli* were isolated from the vagina in 3/23 cases. In only 2/23 samples *Enterococcus faecalis* and a gram-negative, oxidase-positive bacteria were isolated from the cervix uteri. Only *Staphylococcus epidermidis*, in 1/23 case, was isolated from the uterus. Histopathological findings in uterus from samples of Groups II (moderate lesions) and III (severe lesions) did not translated in grossly visible changes. Samples from reproductive tracts with secretion in the vagina and cervix uteri had no detectable changes in the other parameters analyzed from this portion. Uterus with positive bacterial culture had evidence of ascendant inflammation judging by the high granulocyte count in the three analyzed portions. This study reinforces that vaginitis and cervicitis in the cow diagnosed only by clinical examination does not reflect the real status of the uterine health. For this reason, treatment of uterine disorders should be conducted based on reliable tests to determine the appropriate therapy for each situation.

INDEX TERMS: Cattle diseases, reproductive diseases, endometritis.

Doenças reprodutivas causam altas perdas econômicas nos rebanhos bovinos, sendo a endometrite uma das alterações mais relevantes. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar a associação dos achados fisiopatológicos em exames macroscópicos, bacteriológicos, citológicos e histopatológicos nas porções do trato genital de 23 vacas abatidas, bem como avaliar a necessidade de associação destes exames para efetuar diagnóstico fidedigno. A avaliação macroscópica da secreção, os exames histopatológico, citológico e as bactérias identificadas foram correlacionados. Não houve associação ($P>0,05$) dos resultados nas diferentes porções do trato genital. Na vagina foram isoladas as bactérias *Trueperella pyogenes* e *Escherichia coli*. Na cérvix, em apenas 2/23 (8,6%) amostras isolou-se *Enterococcus faecalis* e gram negativo oxidase positiva. No útero houve isolamento apenas da bactéria *Staphylococcus epidermidis*. As amostras histopatológicas classificadas em grupo II e III não apresentaram alterações detectadas no exame macroscópico. As amostras com secreção não fisiológica na vagina e cérvix não apresentaram alterações nos outros exames na porção uterina. A amostra com cultura bacteriológica positiva no útero demonstrou uma infecção ascendente através da alta contagem de granulócitos nas três porções analisadas. O presente estudo reforça o conceito de que a vaginite e cervicite diagnosticadas pelo exame clínico na vaca não retratam o real status da saúde uterina e por esta razão, o tratamento do útero deve ser conduzido com critério, alicerçado nos exames complementares para definir a terapia adequada para cada situação.

INDEX TERMS: Endométrio. Granulócitos. Bactérias. Bovinos.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Departamento de Clínica Grandes Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Camobi, 97.105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Departamento de Medicina Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia 91.540-000 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Corresponding author. Tel.: +55-55 32208501.

E-mail address: juliaspreckelsen@gmail.com

INTRODUCTION

Profitability in cattle raising industry is closely related with a sound reproductive capacity. Reproductive problems are usually multifactorial regarding their causes. Endometritis and metritis are probably the most important pathological conditions of the reproductive tract of cows and responsible for increased intervals between calving, repeated heats, decreased rate of conception, and infertility.

Physiologically, before deliverance the uterine lumen is sterile. However if bacterial invasion does occur it could induce fetal reabsorption or abortion (Semambo et al. 1991, Sheldon 2009). A large spectrum of bacteria was isolated from the uterus of > 90% of cows soon after parturition and this prevalence of infection decreases with time (Elliot et al. 1968).

Different diagnostic methods, including vaginal examination, Metricheck device, ultrasonography, cytology and uterine biopsy have been used to evaluate uterine health status and to orient therapy in cases where pathological conditions are found.

Uterine contaminant bacteria are nonspecific and belong to a great number of bacterial species (Griffin et al. 1974, Sheldon et al. 2002). A number of bacteria, namely *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. and *Bacillus* spp., have been isolated from the uterus of cows without signs or puerperal metritis (Huszenicza et al. 1999) while *T. pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella melaninogenicus*, *Bacteroides* spp. and *Clostridium*, spp. were detected in the uterus from cows with endometritis (Bondurant 1999, Huszenicza et al. 1999, Mateus et al. 2002). The uterine biopsy is ideally used for evaluation of endometrial morphology since the small sample for histological examination is representative of the whole endometrial mucosa. (Bonnett et al. 1991). When the uterus is infected, inflammatory cells infiltrate the endometrium and other acute and chronic inflammation occur (Cordeiro et al. 1989b); those include necrosis, hyperemia, increased numbers of neutrophils, lymphocytes, and macrophages, cystic dilatation of endometrial glands or atrophy associated with compromised reproductive performance (Cordeiro et al. 1989b).

Cytology is an efficient method to evaluate uterine infections in cows (Cordeiro et al. 1989a). Additionally, as pointed out elsewhere neutrophils are the main defense line against infectious agents and there is an accumulation of these cells in the endometrium (Watson, 1990, Butt et al. 1991). Neutrophils will hereafter be referred to as granulocytes in order to accommodate eosinophils and basophils under this denomination.

Examining the general clinical and specific aspects of the reproductive tract of the cow it is hoped that the reproductive changes encountered at gross examination correlate with laboratorial exams. It is hypothesized here that the bacteria found in the vagina and cervix uteri of cows with endometritis do not differ from those found in the endometrium. Based on this hypothesis the necessity of invasive uterine diagnostic methods are questioned as when inflammatory changes can be detected by clinical examination in the vagina and/or cervix uteri.

The objective of this study was evaluate whether there is an association between macroscopic, bacteriological, cytological and histopathological findings in the reproductive tract of slaughtered cows and if this putative association would allow for a reliable diagnosis.

MATERIAL AND METHODS

Animal care and approval. Study design, collection of specimens of was approved by the Ethical Committee of the UFSM and registered under the number 3737040216.

Animals and study design. The study was carried out at the Laboratório de Embriologia Animal (Embryolab) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Southern Brazil, using the grossly healthy reproductive tract (hereafter referred as specimens) of 23 clinically normal slaughtered cows. The specimens were collected at local abattoirs from August-December, 2015.

Sampling. The specimens of slaughtered cows were collected at random in plastic trays previously disinfect with 70% ethanol and cover with sterile surgical field. Each portion of the specimen was cleaned with 70% ethanol immediately before sampling which was performed with gloved hands directly from each portion of the specimen to be analyzed through an incision using a scalpel with a new sterile blade for each portion.

All the portions of the collected specimens were grossly examined for detection of secretion and integrity of the mucosa of vagina, cervix uteri, and uterine horns. Data were written down in a spreadsheet for future correlation. Presence or absence of secretion was classified as (1) absent; (2) clear and translucent mucous; (3) yellow mucous; (4) bloody mucous; (5) mucopurulent; and (6) bloody mucous associated with and edematous specimen wall. Gross aspect classification as 3-5 was considered potentially indicative of inflammation.

Samples for bacteriology and cytology were taken from the cervix uteri, vagina, and from the left uterine horn. Bacteriological and cytological samples were consistently taken in the following sequence: uterine horn, cervix uteri and vagina. From the left horn the bacteriological sample was obtained through the insertion of sterile swab (Absorve®, Citotest Labware Manufacturing CO, China). The collected sample was placed in Stuart medium, identified and kept in a thermos with recycled ice packets. From the same incision, sampling done for cytology was made using a gynecological brush (Vagispec®, Adlin Plásticos LTDA, Jaraguá do Sul, Brazil).

Immediately after sampling, a smear was made with the brush on glass histological slides, which were dried at room temperature. The same procedures were applied to cervix uteri and vagina.

Using a sterile scalpel and scissors 3x2 cm endometrial biopsies were taken from the right uterine horn and fixed in Bouin's solution.

Processing and evaluation of samples. Samples for bacteriology were sent to a reference laboratory accredited ISO9001 for bacterial isolation and identification.

Samples (smears) for cytological examination were stained with panoptic stain (Laborclin®, São José dos Pinhais, Brazil). Cells were identified as epithelial, lymphocytes, monocytes, and granulocytes. One hundred cells were counted in each slide. Endometritis were considered when an excess of 10% granulocytes counted.

The excess Bouin's solution was cleansed from fixed endometrial fragments by successive alcohol baths and then routinely processed for histopathology. Histological findings were classified as shown in Table 1.

Statistical analysis. The obtained data were organized in order to evaluate the association among the results of the various examinations carried out in each portion of the specimen and among different portions of the specimen with each exam. To evaluate the results of uterine histopathology the Comparison of Paired Proportions Test was applied, grouping the data of macroscopic, bacteriological and cytological findings. For the cervix uteri and vagina, and the absence or presence of secretion with pathological aspect. Paired Proportions Comparison Test was applied to granulocytes < 10 and granulocytes > 10, and bacteriology positive or negative. Results as $P < 0.05$ were considered statistically different.

RESULTS

Data on the evaluation of the different portions of the reproductive tract of the 23 slaughtered cows and the results of Paired Proportions Comparison Test applied to the different parts of the reproductive tract are summarized respectively in Tables 2 and 3.

Vagina

Two of the 23 samples had secretion of yellow mucous, 7/23 had translucent mucous secretion and in 14/23 secretion was not detected. Results of cell counting in cytological slides were as follows: in 8/23 there was a proportion $\geq 10\%$ of granulocytes. Only 3/23 of the samples yielded bacterial growth, one of *T. pyogenes* and two of *E. coli*. There was no significant relationship of statistical data ($P > 0.05$) when the correlation of bacteriological, histological exams was applied vaginal samples.

Cervix uteri

Two out of 23 samples displayed yellow mucous; in 2/23 samples had translucent mucous and in 19/23 secretion was not observed. In the evaluation of the cytological slides 3/23 samples had a proportion $\geq 10\%$ of granulocytes. Bacterial culture yielded *Enterococcus faecalis* in 1/23 and a gram-negative, oxidase-positive bacterium in another one (1/23).

Uterus

In eighteen out of the 23 examined uteri no secretion was observed. In the remaining 5 samples, 2 had translucent mucous, one had bloody mucous, one had mucopurulent secretion and in one case the uterus was hemorrhagic and edematous.

Bacterial culture yielded *Staphylococcus epidermidis* from two samples out of the 23 examined.

Moderate histopathological changes (Group II) were found in 5/23 of the endometrial samples, and severe lesions and in 4/23 of the samples. The Paired Proportions Comparison Test applied to uterine samples per each group associated with the macroscopic evaluation of the secretion, percentage of granulocytes and bacteriological results, and also the gross examination of the cervical and vaginal secretions compared with the cytological (percentage of granulocytes) and bacteriological results from samples of different sites of the reproductive tract do not necessarily correlate. In 3/23 of the samples microscopic inflammatory exudate was found but no bacteria was isolated from these samples.

The results from gross, bacteriological, cytological and histopathological exams from the vagina, cervix uteri, and uterus are in Table 2.

DISCUSSION

The pathogenesis of uterine diseases was investigated by several research groups (Thurmond et al. 1993, LeBlanc et al. 2002, Chenault et al. 2004, Kasimanickam et al. 2005, Goshen & Shpigel 2006, Galvão et al. 2009) and there is a well established consensus that endometritis strongly compromises the reproductive performance of cows (Hartmann et al. 2016). Routine diagnostic method used by veterinarian practitioners to identify uterine changes consists in a thorough gynecological exam, which includes rectal and vaginal clinical examination. Uterine diseases in reproductive purpose cows are classified as puerperal metritis, clinical metritis, clinical endometritis and subclinical endometritis (Sheldon et al. 2006).

Clinical endometritis is characterized by purulent (>50% of pus) or mucopurulent (50% pus, 50% mucous) uterine discharge (Sheldon et al. 2006). Endometritis is generally diagnosed by examining the uterus through transrectal palpation to evaluate size, horn symmetry, uterine fluctuation (Grunert 1979) and examining uterine discharge with the help of a vaginal speculum (LeBlanc et al. 2002); (2) The Metricheck device (McDougall et al. 2007); and (3) transrectal palpation with gloved hand (Williams et al. 2005).

In the current study there was a lack of correlation between the presence of vaginal and/or cervical secretion and the presence of uterine disease; nor could be established a correlation between the secretion and complementary exams (bacteriological, cytological and histopathological). These findings strengthen the assertion that the evaluation of non-physiological vaginal secretion is not a reliable diagnostic method for bovine endometritis (McDougall 2001). Recently, the prevalence of cervicitis and its effects in the reproductive performance were studied in dairy cows 42-50 days after parturition through rectal and vaginal exam, cervical and uterine cytology with Citobrush, and endometrial biopsy (Hartmann et al. 2016). Conception rate in cows (n=157) with severe cervicitis and endometritis decreased dramatically (29%) while the conception rates in cows with only cervicitis was 34%. The authors suggest that cervicitis occurs independently from endometritis, since in 66.3% of the exams cervicitis without endometritis was identified. Thus the association of complementary exams is fundamental for the definitive diagnosis.

Although the results of the current study were obtained from specimens collected from slaughtered cows without individual clinical histories, the data clearly demonstrate the need of performing complementary exams to obtain a more accurate information on the uterine status and the related fertility.

The histopathological uterine lesion score shows interesting data. It was found that in 9/23 of the uterus the endometrial lesion score was within Groups II and III, demonstrating that these cows had some degree of fertility compromise. However, only from one cow (Cow 2 in Table 2), a microorganism, *S. epidermidis*, was isolated. Although additional studies are desirable to confirm some of our data, these results suggest that the degree of endometrial inflammation and atrophy do not correlate with bacterial infection.

Out of the 23 reproductive tracts studied 12 had some type of change identified by the complementary exams (Table 1). The most severe change was observed in Cow 2, which presented vaginitis, cervicitis and endometritis diagnosed by the presence of > 10% of granulocytes and positive bacterial cultures.

Two cows (22 and 23) presented only cervicitis diagnosed by the presence of > 10% of granulocytes positive bacterial cultures. Seven cows (3, 4, 11-13, 19 and 21) presented vaginitis, diagnosed by the presence of > 10% of granulocytes in the cytological examination. These data convey that the main criteria for culling cows for slaughter should be the pathological changes in the reproductive tract.

Additionally, these results show that the bacteria presence is generally associated with granulocyte presence, but the inverse is not always true. Bacteriology detected *E. coli* in the vaginal portion in two samples in which the presence of > 84% and 100% of granulocytes was counted on cytological exam and in which, the macroscopic examination detected secretion with pathological characteristics. However, in the cervix uteri and uterus there were no bacterial growth in the absence of abnormal secretion. *T. pyogenes* was cultured from the vaginal portion of one of the reproductive tracts in which 18% of granulocytes was counted on cytological exam.

One of the main uterine problems causing important economic losses is subclinical endometritis (Galvão 2012). This disease is defined by the presence of >10% of granulocytes in the endometrium (Sheldon et al. 2006). None of uterine samples of the current study revealed the right numbers of granulocytes to characterize subclinical endometritis as it is defined (Galvão 2012).

The current study reinforces the concept that vaginitis and cervicitis in the cow diagnosed by the clinical exam do not translate the real uterine health status and, for this reason, the treatment of uterine disease should be conducted within criteria based on complementary exams, which will define the proper therapy in each occasion.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Prof. DMV, MSc. PhD Claudio Severo Lombardo de Barros for his valuable work editing this manuscript in English. This research was sponsored by Embryolab/UFMS-RS/Brazil, and CNPq provided scholarship to the first author.

REFERENCES

- Bondurant R.H. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci*, 77(2):101-110.
- Bonnett B.N., Martin S.W., Gannon V.P., Miller R.B., Etherington W.G. 1991. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res*, 55(2):168-173.
- Butt B.M., Senger P.L., Widders P.R. 1991. Neutrophil migration into bovine uterine lumen following intrauterine inoculation with killed *Haemophilus somnus*. *J Reprod Fertil*, 93(2):341-345.

- Chenault J.R., Mcallister J.F., Chester J.R., Dame K.J., Kausche F.M., Robb E.J. 2004. Efficacy of ceftiofur hydrochloride sterile suspension administered parenterally for the treatment of acute postpartum metritis in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc*, 224:1634-1639.
- Cordeiro J.L.F., Neves J.P., Fan L.C.P., Albuquerque A.J.D., Badke M.R.T., Silva J.H.S. 1989a. Citologia cérvico-uterina para o diagnóstico de catarros genitais na vaca. *Rev Bras Reprod Anim*, 13(1):53-68.
- Cordeiro J.L.F., Barros S.S., Neves J.P. 1989b. Avaliação histopatológica do endométrio de vacas leiteiras com catarro genital. *Rev Bras Reprod Anim*, 13(1):7-14.
- Elliott L., McMahon K.J., Gier H.T., Marion G.B. 1968. Uterus of the cow after parturition with bacterial content. *Am J Vet Res*, 29(1):77-81.
- Galvão K.N., Greco L.F., Vilela J.M., Sá Filho M.F., Santos J.E.P. 2009. Effect of intrauterine infusion of ceftiofur on uterine health and fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, 92:1532-1542.
- Galvão K.N. 2012. Enfermidades uterinas durante o período pós-parto em vacas de leite. *Anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, 184 - 190.
- Griffin J.F.T., Hartigan P.J., Nunn W.R. 1974. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometriosis during the first seven weeks postpartum. *Theriogenology*, 1(3):91-106.
- Grunert E. 1979. Female genital system. In Rosenberger, G. Dirksen G, Gründer, H.D. Grunert E. Krause, D., Stöber M. Ed. *Clinical Examination of cattle*. Berlin and Hamburg: Paul Parey. pp. 323-350.
- Goshen T, Shpigel N.Y. 2006. Evaluation of intrauterine antibiotic treatment of clinical metritis and retained fetal membranes in dairy cows. *Theriogenology*, 66:2210-2218.
- Hartmann D., Rohkohl J., Merbach S., Heilkenbrinker T., Klindworth H.P., Schoon H.A., Hoedemaker M. 2016. Prevalence of cervicitis in dairy cows and its effect on reproduction. *Theriogenology*, 85:247-253.
- Huszenicza G., Fodor M., Gacs M., Kulcsar M., Dohmen M.J.W., Vamos M., Porkolab L., Kegl T., Bartyik J., Lohuis J.A.C.M., Janosi S., Szita G. 1999. Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. *Reprod Domest Anim*, 34(3-4):237-245.
- Kasimanickam R., Duffield T.F., Foster R.A., Gartley C.J., Leslie K.E., Walton J.S., Johnson W.H. 2005. The effect of a single administration of cephapirin or cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology*, 63:818-830.
- Le Blanc S.J., Duffield T.F., Leslie K.E., Bateman K.G., Keefe G.P., Walton J.S., Johnson W.H. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, 85:2223-2236.
- Mateus L., da Costa L.L., Bernardo F., Silva JR. 2002. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 37(1):31-35.
- McDougall S. 2001. Effect of intrauterine antibiotic treatment on reproductive performance of dairy cows following periparturient disease. *New Zeal Vet J*, 49:150-158.
- Semambo D.K., Ayliffe T.R., Boyd J.S., Taylor D.J. 1991. Early abortion in cattle induced by experimental intrauterine infection with pure cultures of *Actinomyces pyogenes*. *Vet Rec*, 129(1):12-16.
- Sheldon I.M., Noakes D.E., Rycroft A.N., Pfeiffer D.U., Dobson H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reprod*, 123(6):837-845.
- Sheldon I.M., Lewis G.S., Leblanc S., Gilbert R.O. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65:1516-1530.
- Sheldon I.M. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*, 81(6):1025-1032.

- Sheldon I.M., Rycroft A.N., Dogan B., Craven M., Bromfield J.J., Chandler A., Roberts M.H., Price S.B., Gilbert R.O., Simpson K.W. 2010. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS ONE*, 5(2), e9192.
- Thurmond M.C., Jameson C.M., Picanso J.P. 1993. Effect of intrauterine antimicrobial treatment in reducing calving-to-conception interval in cows with endometritis. *J Am Vet Med Assoc*, 203:1576-1578.
- Watson E.D. 1990. Antibody response in the bovine genital tract to intrauterine infusion of *Actinomyces pyogenes*. *Res Vet Sci*, 48(1):70-75.
- Williams E.J., Fischer D.P., England G.C.W., Dobson H., Pfeiffer D.U., Sheldon I.M. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the inflammatory response to endometritis in cattle. *Theriogenology*, 63:102-117.

Table 1**Classification of histological findings in the 23 reproductive tracts collect from slaughtered cows**

Group	Histological findings
I	Endometrium either without pathological changes or with mild changes, such as mild inflammatory mononuclear focal infiltrate, mild focal periglandular fibrosis and a few dilated glandular lumina.
II	Endometrium with more severe changes than those of Group I, such as diffuse granulocyte infiltrate, moderate mononuclear infiltrate with or without lymphoid nodules. Moderate focal fibrosis with or without associated mild to moderate dilatation of some glandular lumina.
III	Endometrium with severe pathological changes which would significantly compromise fertility. These changes include diffuse mononuclear infiltrate associated or not with lymphoid follicles, multifocal or diffuse fibrosis, regardless of the degree of severity, and glandular nests with dilated glandular lumina; endometrial hypoplasia; pyometra; endometrial atrophy.

Table 2
Data on the evaluation of the different portions of the reproductive tract of 23 slaughtered cows

	Vagina			Cervix uteri			Uterus			
	Bacteriology	Secretion	Granulocytes (%)	Bacteriology	Secretion	Granulocytes (%)	Bacteriology	Secretion	Granulocytes (%)	Histopathology
1		1	0		1	0		1	0	GI
2		1	96		1	10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1	GIII
3		1	92		1	0		1	0	GII
4		1	88		1	0		1	0	GII
5		1	0		2	1		2	0	GI
6		1	0		3	3		1	0	GI
7		1	0		1	0		1	0	GI
8		2	2		1	0		1	0	GI
9		1	0		1	0		5	0	GIII
10		2	1		1	0		6	0	GIII
11		2	10		1	0		1	0	GII
12	<i>Escherichia coli</i>	3	84		1	9		1	0	GI
13	<i>Escherichia coli</i>	3	100		1	0		1	0	GII
14		2	4		1	0		1	0	GI
15		2	4		2	2		2	0	GI
16		1	0		1	0		1	0	GI
17		1	0		1	0		4	0	GI
18		2	6		3	5		1	0	GI
19		2	15		1	0		1	0	GI
20		1	0		1	0		1	0	GI
21	<i>Trueperella pyogenes</i>	1	18		1	0		1	0	GII
22		1	0	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	37		1	0	GIII
23		1	0	Gram - Oxidase +	1	22		1	0	GI

Secretion: (1) absent; (2) clear and translucent mucous; (3) yellow mucous; (4) bloody mucous; (5) mucopurulent; and (6) bloody mucous associated with and edematous specimen wall.

Table 3

Relationship of the histopathology (Groups I and III) with gross characteristic of uterine secretion, granulocytes per 100 cells and bacteriological culture, and relationship of the proportion granulocytes per 100 cells, granulocytes per 100 cells with the gross aspect of the secretion sampled from the lumen of the cervix uteri, vagina and uterus from 23 slaughtered cows.

Uterus							Total
	GI		GII		GIII		
	n (%)		n (%)		n (%)		
Absence of secretion	13 (56.52)	P > 0.05	5 (21.73)	P > 0,05	2 (8.69)	P > 0.05	20
Secretion with pathological aspect	1 (4.34)		0 (0)		2 (8.69)		3
Granulocytes < 10	14 (60.86)	P > 0.05	5 (21.73)	P > 0,05	4 (17.39)	P > 0.05	23
Granulocytes > 10	0 (0)		0 (0)		0 (0)		0
Positive bacterial culture	14 (60.86)	P > 0.05	5 (21.73)	P > 0,05	3 (13.04)	P > 0.05	22
Negative bacterial culture	0 (0)		0 (0)		1 (4.34)		1
Cervix uteri							
	Absence of secretion		Secretion with pathological characteristics				
	n (%)		n (%)				
Granulocytes < 10	18 (78.26)	P > 0.05	2 (8.69)	P > 0.05	-		20
Granulocytes > 10	3 (13.04)		0 (0)		-	3	
Positive bacterial culture	19 (82.60)	P > 0.05	2 (8.69)	P > 0.05	-		21
Negative bacterial culture	2 (8.69)		0 (0)		-	2	
Vagina							
	Absence of secretion		Secretion with pathological characteristics				
	n (%)		n (%)				
Granulocytes < 10	15 (65.21)	P > 0,05	0 (0)	P > 0.05	-		15
Granulocytes > 10	6 (26.08)		2 (8.69)		-	8	
Positive bacterial culture	20 (86.95)	P > 0,05	0 (0)	P > 0.05	-		20
Negative bacterial culture	1 (4.34)		2 (8.69)		-	3	

GI (Group I) Endometrium either without pathological changes or with mild changes, such as mild inflammatory mononuclear focal infiltrate, mild focal periglandular fibrosis and a few dilated glandular lumina.

GII (Group II) Endometrium with more severe changes than those of GI, such as diffuse neutrophilic infiltrate, I moderate, mononuclear infiltrate with or without lymphoid nodules. Moderate focal fibrosis with or without associated mild to moderate dilatation of some glandular lumina.

GIII (Group III) Endometrium with severe pathological changes which would significantly with fertility. These changes include diffuse mononuclear infiltrate associated or not with lymphoid follicles, multifocal or diffuse fibrosis regardless of the degree of severity and glandular nests with dilated of glandular lumina; endometrial hypoplasia; pyometra; endometrial atrophy.

4. CONCLUSÕES

Em todas as porções do trato genital a ausência de bactérias foi associada com baixa contagem de granulócitos e com a ausência de secreção com características patológicas.

O presente estudo reforça o conceito de que a vaginite e cervicite diagnosticadas pelo exame clínico na vaca não retratam o real status da saúde uterina e por esta razão, o tratamento do útero deve ser conduzido com critério, alicerçado nos exames complementares para definir a terapia adequada para cada situação.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. R. et al. Estudo epidemiológico de problemas reprodutivos em rebanhos bovinos na bacia leiteira de Goiânia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 720-725, 2005.
- BARLUND, C. S. et al. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 6, p. 714-723, 2008.
- BICALHO, R. C. et al. Molecular and epidemiological characterization of bovine intrauterine *Escherichia coli*. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5818-5830, 2010.
- BICALHO, M. L. S. et al. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 125-131, 2012.
- BONDURANT, R. H. Inflammation in the bovine female reproductive tract. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 101-110, 1999.
- BONNETT, B. N. et al. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 2, p. 168, 1991.
- BRETZLAFF, K. Rationale for treatment of endometritis in dairy cow. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 3, n. 3, p. 593-607, 1987.
- BUTT, B. M.; SENGER, P. L. WIDDERS, P. R. Neutrophil migration into bovine uterine lumen following intrauterine inoculation with killed *Haemophilus somnus*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 2, p. 341-345, 1991.
- CORDEIRO, J. L. F. et al. Citologia cérvico-uterina para o diagnóstico de catarros genitais na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, n. 1, p. 53-68, 1989a.
- CORDEIRO, J. L. F.; BARROS, S. S.; NEVES, J. P. Avaliação histopatológica do endométrio de vacas leiteiras com catarro genital. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 1989b.
- CHEONG, S. H. et al. Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. **Theriogenology**, v. 77, n. 5, p.858-864, 2012.
- DAWSON, F. L. M. The normal bovine uterus physiology, histology, and bacteriology. **Veterinary Reviews and Annotations**, v. 5, p. 73-89, 1959.
- DHALIWAL, G. S.; MURRAY, R. D.; DOBSON, H. Effects of milk yield, and calving to first service interval, in determining herd fertility in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1996.

DRILLICH, M. et al. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2010-2017, 2001.

DUBUC, J. et al. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5225-5233, 2010.

FOURICHON, C.; SEEGERS, H.; MALHER, X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. **Theriogenology**, v. 53, n. 9, p. 1729-1759, 2000.

GILBERT, R. O. et al. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, n. 9, p. 1879-1888, 2005.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia**. Livraria Varela, 2005.

GIULIODORI, M. J. et al. Metritis in dairy cows: risk factors and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 6, p. 3621-3631, 2013.

HUSZENICZA, G. Y. et al. Uterine bacteriology, resumption of cyclic ovarian activity and fertility in postpartum cows kept in large-scale dairy herds. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 3-4, p. 237-245, 1999.

JANEWAY Jr. C. A. et al. Infectious agents and how they cause disease. **Immunobiology: the immune system in health and disease**. New York: Garland Publishing, p. 382-388, 2001.

KASIMANICKAM R. et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v. 62, n. 1, p. 9-23, 2004.

KENNEDY, P. C.; JUBB, K. V. F.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4 edição San Diego: Academic Press, 1993.

LEBLANC, S. J. et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis, and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2223-2236, 2002.

LEBLANC, S. J. Special Issue: Production diseases of the transition cow. Postpartum uterine diseases and dairy herd reproductive performance: A review. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 102-114, 2008.

LEBLANC, S. J. El efecto de la salud durante el período de transición sobre el rendimiento reproductivo de las vacas lecheras. In: XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, p. 73-87, 2015.

MACHADO, V. S. et al. Investigation of postpartum dairy cows' uterine microbial diversity using metagenomic pyrosequencing of the 16S rRNA gene. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 460-469, 2012.

MARKUSFELD, O. Factors responsible for post parturiente metritis in dairy cattle. **The Veterinary Record**, v. 114, n. 22, p. 539-542, 1984.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MILLER, A. N. A. et al. The effects os *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and uterine and ovarian function in vivo. **Theriogenology**, v. 68, n. 7, p. 972-980, 2007.

MOSCUZZA, C. et al. Endometrial cytology as a diagnostic tool for subclinical endometritis in beef heifers. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 39, n. 1, p. 24-41, 2015.

NAGARAJA, T. G. et al. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. **Anaerobe**, v. 11, n. 4, p. 239-246, 2005.

POTTER, T. J. et al. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle, **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 127-134, 2010.

PRUNNER, I. et al. Risk factors for uterine diseases on small – and medium – sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. **Theriogenology**, v. 82, n. 6, p. 857-865, 2014.

RADOSTITS O. M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737 p. 2002.

SANTOS, A. D. F. et al. Tratamento de endometrite bovina pós puerperal pelas vias intramuscular e intrauterina. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n. 2, p. 2009.

SANTOS, T. M.; GILBERT, R. O.; BICALHO, R. C. Metagenomic analysis of the uterine bacterial microbiota in healthy and metritic postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 291-302, 2011.

SANTOS, T. M.; BICALHO, R. C. Diversity and sucession of bacterial communities in the uterine fluido of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e53048, 2012.

SCHUENEMANN, G. M. et al . Dairy calving management: effect of perineal hygiene scores on metritis. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 744, 2011.

SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 295–306, 2004.

SHELDON, I. M. et al. Defining postpartum uterine disease in cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1516-1530, 2006.

SHELDON, I. M. et al. Defining post partum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 6, p. 1025-1032, 2009.

SHELDON, I. M. et al. Innate immunity and inflammation of the bovine female reproductive tract in health and disease. **Reproduction**, v. 148, n. 3, p. R41-R51, 2014.

STUDER, E.; MORROW, D. A. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 172, n. 4, p. 489-494, 1978.

TIMARÁN, V. et al. Endometritis subclínica diagnosticada mediante cytobrush y comportamiento reproductivo em vacas del municipio de Pupiales, Colombia. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 27, p. 111-120, 2014.

USMANI, R. H. et al. Effect of subclinical uterine infections on cervical and uterine involution, estrus activity and fertility in postpartum buffaloes, **Theriogenology**, v. 55, n. 2, p. 563-571, 2001.

WATSON, E. D. Antibody response in the bovine genital tract to intrauterine infusion of *Actinomyces pyogenes*. **Research in Veterinary Science**, v. 48, n. 1, p. 70-75, 1990.

WEHREND, A.; FAILING, K.; BOSTEDT, H. Cervimetry and ultrasonographic observations of the cervix regression during the first 10 days postpartum. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 50, n. 9, p. 470-473, 2003.

WILLIAMS, E. J. et al. Clinical evaluation of the postpartum vaginal mucus reflects on bacterial infection and the inflammatory response to endometritis in cattle. **Theriogenology**, v. 63, n. 1, p. 102-117, 2005.

WILLIAMS, E. et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 549-559, 2007.

YASUI, T. et al. Effects of chromium propionate supplementation during the periparturient period and early lactation on metabolism, performance, and cytological endometritis in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6400-6410, 2014.