

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“Comparación de técnicas para el diagnóstico de endometritis pos
parto en alpacas”

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. GLORIA ESTEFANY MAMANI SERGO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

“Comparación de técnicas para el diagnóstico de endometritis pos parto en alpacas”

PRESENTADA POR:

Bach. Gloria Estefany Mamani Sergio



PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

APROBADA POR:

PRESIDENTE

:

MVZ Ciriaco Teodoro Zuñiga Zuñiga

PRIMER MIEMBRO

:

Mg.Sc. Juan Guido Medina Suca

SEGUNDO MIEMBRO

:

Mg.Sc. Nubia Lilia Catacora Florez

DIRECTOR

:

MVZ Rolando Guadalupe Alencastre Delgado

ASESOR

:

Mg.Sc. Hugo Wenceslao Deza Calsin

Área : Salud Animal

Tema : Citología uterina

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este trabajo de tesis a Dios por ser el báculo de toda mi vida, a mis padres Francisco Mamani Zuñiga y Prudencia Sergio Churata por su inagotable ayuda, inmenso amor y confianza vertida para la realización de mi vida profesional.

A mis hermanos Nelly Denisse, Abel Francisco y David Alberto por ser mis cómplices, ejemplos de vida, por su apoyo y consejo durante mi formación profesional.

A todas las personas y amigos que me apoyaron a formarme como una persona culta, con buenos valores y con un futuro profesional, en especial a mis padres y maestros.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Rolando Guadalupe Alencastre Delgado, mi amigo y director, por la confianza incondicional que depositó en mí al aceptar guiarme en este largo camino, y por su constante presencia, paciencia y consejos durante el diseño y desarrollo del trabajo.

Al Dr. Hugo Wenceslao Deza Calsin, mi amigo y asesor, quien depositó su confianza en mí para guiarme en este largo camino, por sus consejos amables, paciencia, predisposición y optimismo durante el transcurso de este tiempo.

A la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, escuela profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial para su plana docente que son fuente de sabiduría y cultura quienes forman profesionales de gran sabiduría científica y técnica en las ciencias de la Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, por permitirme realizar esta investigación, por el apoyo de su personal administrativo, trabajadores y practicantes.

A mis amigos y colegas, Rassiell Macedo, Wacner Chambi, Cesar Mantilla y Adco Medina, quienes con su permanente apoyo y comprensión me permitieron desarrollar el presente estudio.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	7 -
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	8 -
RESUMEN	9 -
ABSTRACT	10 -
I. INTRODUCCIÓN	11 -
II. REVISIÓN DE LITERATURA	13 -
2.1. Anatomía del útero de la hembra.....	13 -
2.1.1. Útero.....	13 -
2.1.2. Histología del útero.....	14 -
2.2. Empadre en alpacas	15 -
2.3. Fertilidad.....	16 -
2.4. Endometritis.....	16 -
2.4.1. Definición	16 -
2.4.2. Clasificación clínica de la endometritis.....	17 -
2.4.3. Causas	17 -
2.4.4. Agentes patógenos.....	18 -
2.4.5. Signos clínicos y lesiones	21 -
2.5. Técnicas de diagnóstico.....	21 -
2.5.1. Citología uterina.....	22 -
2.6. Técnica de tinción.....	25 -
2.6.1. Tinción Diff-Quik.....	25 -
2.6.2. Tinción Giemsa.....	26 -
2.7. Ultrasonografía	26 -
2.7.1. Utilidad de la ultrasonografía.....	28 -
2.7.2. Técnica de ultrasonografía	28 -
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30 -

3.1.	Ámbito de estudio-----	30 -
3.2.	Duración del estudio-----	31 -
3.3.	Material experimental -----	31 -
3.3.1.	Animales-----	31 -
3.3.2.	Materiales -----	32 -
3.4.	Metodología-----	34 -
3.4.1.	Toma de muestras de citología uterina -----	34 -
3.4.2.	Tinción de muestras de citología uterina -----	38 -
3.4.3.	Lectura de las láminas -----	39 -
3.4.4.	Ultrasonografía-----	40 -
3.5.	Análisis estadístico-----	41 -
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	43 -
4.1.	Evaluación de la técnica de muestreo de citología uterina en el diagnóstico de endometritis en alpacas -----	43 -
4.2.	Evaluación de la técnica de tinción usada en la determinación de endometritis -----	45 -
4.3.	Evaluación de la ultrasonografía en la determinación de endometritis -----	46 -
4.4.	Diagnóstico de endometritis por citología endometrial y ultrasonografía-----	50 -
V.	CONCLUSIONES -----	53 -
VI.	RECOMENDACIONES -----	54 -
VII.	REFERENCIAS -----	55 -

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Técnicas de diagnóstico por citología uterina -----	43 -
Tabla 2. Técnicas de tinción para la evaluación de citología uterina. -----	45 -
Tabla 3. Diámetro de cuernos uterinos evaluados por ultrasonografía -----	47 -
Tabla 4. Diámetro de los cuernos uterinos derecho e izquierdo -----	48 -
Tabla 5. Diámetro de cuernos uterinos en alpacas vacías y preñadas -----	49 -
Tabla 6. Porcentaje de alpacas diagnosticadas positivas a endometritis -----	51 -

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

C°	: Grados centígrados
cm	: Centímetros
CV	: Coeficiente de variación
Fr	: Calibre de sonda Foley
Km	: Kilómetro
Mhz	: Megahertz
mm	: Milímetros
mL	: Mililitros
m.s.n.m.	: Metros sobre el nivel del mar
PBS	: Fosfato buffer salino
PMN	: Polimorfo nucleares
s	: Segundos
μL	: Micro litros
%	: Porcentaje
G	: fuerza g

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar dos técnicas de citología endometrial y la ultrasonografía en el diagnóstico de endometritis sub clínica pos parto en alpacas, se realizó el presente estudio en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla. La citología uterina por citocepillo y lavado uterino, así como la ultrasonografía se realizó en 20 alpacas primíparas y 19 multíparas a los 21 días pos parto, las muestras de citología fueron teñidas con Diff Quik y Giemsa, para determinar la proporción de neutrófilos y correlacionarlos con la medición del diámetro de los cuernos uterinos evaluados por ultrasonografía transrectal. La proporción de neutrófilos fue superior ($p < 0.05$) al utilizar la técnica de citocepillo (18.54%) respecto al lavado uterino (4.48%), sin diferencias ($p > 0.05$) entre el tipo de tinción utilizado (Diff Quik o Giemsa). En la determinación de endometritis, se observó que el citocepillo permitió diagnosticar un mayor ($p < 0.05$) porcentaje de hembras con endometritis (75.00%), comparado con la ultrasonografía (48.71%) y el menos preciso fue el lavado uterino (21.05%). El diámetro de cuernos uterinos fue similar ($p > 0.05$) entre alpacas primíparas (16.60 ± 3.80 mm) y multíparas (17.37 ± 4.20 mm); sin embargo, el diámetro del cuerno uterino izquierdo (17.90 ± 4.14 mm) fue mayor ($p < 0.05$) al cuerno uterino derecho (16.05 ± 3.66 mm). Así como el diámetro de cuerno uterino fue mayor ($p < 0.05$) en alpacas que quedaron vacías (17.95 ± 3.75 mm) respecto de las que lograron quedar preñadas (16.05 ± 4.04 mm). No hubo correlación entre el porcentaje de neutrófilos determinados por citología endometrial con las medidas de los cuernos uterinos ($r = 0.14$). En conclusión, la técnica del citocepillo fue eficiente en la evaluación de citología endometrial, la cual al ser teñida con Diff Quik, permite un diagnóstico rápido y seguro de endometritis sub clínica, que complementado con la evaluación ultrasonográfica permiten optimizar el desempeño reproductivo de las alpacas.

Palabras clave: Alpaca, citología endometrial, Diff Quik, ultrasonografía.

ABSTRACT

The objective was to evaluate two techniques of endometrial cytology sampling and the use of ultrasound in primiparas and multiparous alpacas in their postpartum period, to diagnosis subclinical endometritis. The trial was made in Chuquibambilla Research and Production Center. Alpacas of Suri breed, 20 primiparas, and 19 multiparous was sampled by cytobrush and uterine lavage at 21 days after partum, and processed with both Diff Quik, and Giemsa stain. The proportion of neutrophils, and their correlation coefficient was determined between endometrial cytology and measurement of the diameter of the uterine horns evaluated by ultrasound. Significant differences ($p < 0.05$) were observed. Higher neutrophil percentage were found when samples were taken with a cytobrush (18.54%) than uterine lavage (4.48%). Whereas, there was no significant difference ($p > 0.05$) between two staining techniques used. Respect to the diameter of the uterine horns, the diameter of the left uterine horn was greater, but was not related ($r = 0.14$) with the proportion of neutrophils found in the evaluation of endometrial cytology. The best technique to take endometrial cytology samples was cytobrush, because a higher percentage of alpacas diagnosed with subclinical endometritis (75%) was obtained by this technique, followed by a 48% of alpacas who were diagnosed with subclinical endometritis by the technique of ultrasonography, unlike the uterine lavage which alone 25% of alpacas were positive to subclinical endometritis. However, all females that were pregnant had a smaller diameter of uterine horn as opposed to those that were empty that had a significantly greater uterine horn diameter ($p < 0.05$). In conclusion, the use of the cytobrush technique and the Diff Quik staining allow a rapid and safe evaluation of the proportion of neutrophils in samples of endometrial cytology in alpacas, supported by ultrasonography that could optimize the reproductive performance of alpacas.

Keywords: Alpaca, endometrial cytology, cytobrush, uterine lavage, Diff Quik,

I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos son considerados como un importante recurso en la producción animal en muchas áreas del mundo (Tibary *et al.*, 2006) y el Perú es el primer productor con una población aproximada de 3 685 500 animales, de los cuales el 70% se ubican en el departamento de Puno y habitan los altos andes, constituyendo la única fuente de sustento económico para muchas de las familias que habitan regiones por encima de los 4000msnm (Huanca *et al.*, 2007); convirtiéndose en un importante recurso genético, económico, social y cultural de nuestro país.

En camélidos sudamericanos, la tasa de fertilidad puede considerarse baja y en la actualidad ha sido atribuida en 50 a 57.8% a la mortalidad embrionaria que se produciría hasta los 30 días de gestación (Fernández-Baca *et al.*, 1970; Bravo y Sumar, 1985; Tibary *et al.*, 2006). Sin embargo; por el alto porcentaje de hembras que quedan vacías (14 – 54%) después de un proceso de empadre (Sapana *et al.*, 2012), se podría asumir que las hembras estarían siendo afectadas por infecciones uterinas, siendo las más comunes la endometritis, metritis y piometra; que son la mayor causa de infertilidad adquirida en camélidos (Tibary y Anouassi, 2001; Tibary *et al.*, 2001; Tibary *et al.*, 2006).

En muchas especies la endometritis subclínica es una de las más importantes dificultades que afecta el desempeño reproductivo. Ésta puede ser definida como la inflamación superficial del endometrio no más profunda que el estrato esponjoso (Bondurant, 1999) sin signos clínicamente visibles, pero que afectan significativamente la reproducción de los animales (Kasimanickam *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2005).

La citología endometrial es considerada la mejor técnica de diagnóstico de la endometritis subclínica debido a su facilidad y buena confianza en sus resultados (Kasimanickam *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2005). Dos técnicas son empleadas para la toma de muestras, la más usada es la del cito cepillo y la otra técnica es el lavado uterino con bajos volúmenes (Tibary y Anouassi, 2001; Kasimanickam *et al.*, 2004; Gilbert *et al.*, 2005).

En la actualidad cualquiera de las técnicas se apoya en el uso de la ultrasonografía, la cual ha resultado ser de importancia pues ha podido ayudar en la predicción y diagnóstico de endometritis subclínica, constituyendo un medio de diagnóstico rápido y eficiente en otras especies domésticas (Kasimanickam *et al.*, 2005).

En base a los antecedentes expuestos y bajo la premisa de que la mortalidad embrionaria no sería la única causa de las bajas tasas de fertilidad en alpacas, se realizó el presente trabajo de investigación, el cual tuvo por objetivos: evaluar la citología uterina colectada por cito cepillo y por lavado uterino para la determinación de endometritis sub clínica post parto en alpacas de la raza Suri, evaluar el uso de dos técnicas de tinción para la determinación de endometritis sub clínica post parto en alpacas y evaluar el uso de la ultrasonografía en la determinación de las características del contenido uterino y diámetro de los cuernos uterinos para el diagnóstico de la endometritis sub clínica post parto en alpacas de la raza Suri.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Anatomía del útero de la hembra

2.1.1. Útero

Anatómicamente el útero se continúa cranealmente con el oviducto y caudalmente con la vagina. Está constituido por un cuello o cérvix, un cuerpo y dos cuernos, presenta una forma parecida a la letra “Y” (García *et al.*, 2005). La cérvix es una porción cilíndrica, estrecha, de 2-3 cm de largo y en su interior presenta 3 a 4 pliegues (Bustinza, 2001).

El cuerpo del útero es cilíndrico, aplanado y mide 3 cm; su cara dorsal se relaciona principalmente con el recto y su cara ventral está en contacto con la vejiga. El fondo del útero es la porción en donde divergen los cuernos uterinos. Los dos cuernos uterinos son cilíndricos de forma espiral y no simétrica, localizándose en el interior de la pelvis (Sato y Montoya, 1990). Está suspendido de las paredes abdominales y pélvicas por amplios ligamentos (Fowler, 1998); el cuerno izquierdo es ligeramente más grande que el derecho (García *et al.*, 2005), desde la etapa fetal y prepuberal (Mendoza *et al.*, 2013; Tibary y Anouassi, 1997), esta diferencia se acentúa en las hembras multíparas como consecuencia de que el 98% de las gestaciones tienen lugar en el cuerno izquierdo (Fernández *et al.*, 1973; Ferrer, 2014; Bravo *et al.*, 1995).

El cuerno izquierdo es generalmente de 7.9 ± 1.3 cm y el cuerno derecho de 7.4 ± 0.9 cm de largo (García *et al.*, 2005 y Peso *et al.*, 2014), el diámetro proximal del cuerno derecho a los 30 días post parto es aproximadamente de

1.0 cm (Exelmes, 2005), con extremos de 0.7 a 2.5 cm (Zirena, 1978), y el diámetro del cuerno izquierdo en alpacas pre grávidas es de 2.27 cm (Exelmes, 2005); las puntas de los cuernos presentan una terminación redondeada y el oviducto se abre en los cuernos uterinos por un pequeño orificio (papila) el cual actúa como un esfínter bien definido (García *et al.*, 2005; Peso *et al.*, 2014).

2.1.2. Histología del útero

Histológicamente el útero está constituido por tres capas de tejido. En la superficie externa del útero se encuentra el perimetrio, formado por una capa serosa que constituye una prolongación del peritoneo y una capa delgada de tejido conjuntivo. El miometrio, constituido por fibras de músculo liso, distribuido en una gruesa capa circular interna y una externa longitudinal más delgada, separadas ambas por una capa vascular. La mucosa del órgano, el endometrio, varía constantemente con las alteraciones hormonales durante los ciclos estrales y con la gestación. El epitelio de revestimiento interno es un epitelio simple columnar o simple cúbico con algunas porciones ciliadas. Bajo el epitelio de revestimiento se encuentra el estroma formado por tejido conectivo en donde se encuentran glándulas simples ramificadas denominadas glándulas uterinas (Salomon *et al.*, 2005; Welsch y Sobotta, 2005; Liebich, 2010).

El endometrio está constituido por dos capas, el epitelio luminal y la lámina propia, el primero está formado por células cuboidales altas asentadas en la membrana basal, el segundo posee dos estratos, compacto y esponjoso

(Kenney, 1978); el estrato compacto está compuesto de células ovaladas estromáticas, de gran núcleo y escaso citoplasma; el estrato esponjoso, en cambio posee pocas células dispersas, lo que le atribuye este aspecto, además en el estrato esponjoso se ubica un gran número de glándulas endometriales, de epitelio secretor cuboidal, que poseen 2 ó 3 ramas primarias y aproximadamente 10 ramas secundarias, además, junto a las glándulas en este segmento es posible ubicar vasos sanguíneos y linfáticos (Kenney, 1978).

2.2. Empadre en alpacas

Generalmente el periodo de apareamiento se da a los 20 a 40 días pos parto (Tibary y Anouassi, 2001), momento en el cual la hembra se encontrara en un periodo de receptividad y se deja montar en posición de pie para luego adoptar la posición de decúbito esternal con los cuatro miembros debajo del cuerpo, sentándose el macho sobre la hembra y un poco por detrás de la misma. La cópula se realiza en esa posición durante un período prolongado (8.1 ± 5.4 minutos) en alpacas (Sumar, 1991). La deposición seminal es intrauterina, intermitente y sin fracciones (Lichtenwalner et al., 1996) y durante la cópula los machos emiten sonidos guturales insuflando sus mejillas.

Los estudios realizados por Tibary y Anouassi (1996); Tibary y Memon (1999) han demostrado que la receptividad de las hembras no está necesariamente correlacionado con la actividad ovárica; y este método conduce a múltiples apareamientos que tienen pocas posibilidades de éxito y en su lugar puede causar daños en el endometrio y el cuello uterino.

2.3. Fertilidad

Los camélidos son tan fértiles como otros tipos de animales domésticos, el 90% de los camélidos hembras conciben o preñan en los tres primeros intentos de apareamiento después de alcanzar la pubertad o post – parto, las tasas de concepción y natalidad en los camélidos varían de 50 a 90% dependiendo del sistema de apareamiento utilizado, la fertilidad del padre y la madre, intervalo post - parto, las condiciones ambientales y la nutrición (Adams *et al.*, 1990; Fernández-Baca *et al.*, 1970).

2.4. Endometritis

2.4.1. Definición

Es la inflamación superficial del endometrio, que no se extiende más allá del estrato esponjoso y los tejidos glandulares subyacentes, con evidencia histológica de inflamación (Sheldon *et al.*, 2006). Este proceso es caracterizado por cambios degenerativos en el epitelio superficial, congestión vascular con edema en el estroma y migración de neutrófilos y otras células inflamatorias al área afectada (Foldi *et al.*, 2006).

La endometritis puede incluir diversos cuadros inflamatorios localizados en la vagina (vaginitis), cérvix (cervicitis) o en el endometrio (endometritis o metritis) y se presenta en forma esporádica (Peso *et al.*, 2014; Bustinza, 2001); produciéndose por lo menos 21 días después del parto y no se asocia con una enfermedad sistémica (Sheldon *et al.*, 2006); y es la patología más común seguida por fibrosis endometrial (Tibary *et al.*, 2001).

2.4.2. Clasificación clínica de la endometritis

2.4.2.1. Endometritis clínica

La endometritis clínica se define como la inflamación del endometrio con presencia de descarga vaginal purulento o mucopurulento y generalmente se presenta después de los 21 o 26 días después del parto (Sheldon *et al.*, 2006).

2.4.2.2. Endometritis subclínica

La endometritis subclínica se define como la inflamación endometrial con ausencia de secreción uterina; y que usualmente es diagnosticado por citología (Sheldon *et al.*, 2006; Foldi *et al.*, 2006); donde la endometritis subclínica está definido como el hallazgo de una cantidad de neutrófilos mayor al 3% en muestras de citología uterina colectadas entre los 21-33 días después del parto (Tibary y Anouassi, 2001).

2.4.3. Causas

La endometritis se presenta con mayor frecuencia durante el empadre, cuando se tiene antecedentes de repetición del empadre o apareamiento excesivo durante el periodo de receptividad (Tibary *et al.*, 2001; Tibary y Anouassi, 2001), en casos de abortos (Tibary y Anouassi, 2001), en la parición por partos distócicos y prolapso uterino (Peso *et al.*, 2014); complicaciones pos parto (contaminación del útero al momento del parto) ello cobra importancia dado que son las infecciones uterinas el problema reproductivo más común que da por resultado un incremento en los problemas de fertilidad en camélidos (Fowler, 1998; y Tibary y Anouassi, 1997, 2001; Wernery y

Kumar, 1995; Wernery y Wernery, 1992) y el examen ginecológico o manipulación antihigiénica (Tibary y Anouassi, 2001).

Los patógenos más comunes que se encuentran en un proceso de endometritis son: el *Streptococcus zooepidermicus*, *Staphylococcus aureus* (Bustanza, 2001; Tibary y Anouassi, 2001), *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Escherichia* y *Micrococcus* (Tibary y Anouassi, 2001).

Uno de los factores para que se produzca la infección uterina bacteriana depende en parte de la situación endócrina; en particular la progesterona que actúa como supresor de las defensas inmunitarias uterinas. La formación del primer cuerpo lúteo (CL) luego del parto y el incremento de progesterona (P4) preceden al surgimiento de la enfermedad uterina (Del Vecchio et al., 1994).

2.4.4. Agentes patógenos

El tracto genital de las hembras posee flora bacteriana en casi toda su extensión, a excepción del útero, ya que allí por lo general no habitan microorganismos, aunque esto puede variar de acuerdo con el estatus inmunológico del animal; además durante la gestación y el parto el cuello uterino y el útero no se encuentran totalmente estériles, donde se puede encontrar microorganismos oportunistas, que producirán inflamación e infección (Sanchez *et al.*, 2011).

Mendez (2008) y Palmer *et al.* (2008a), indican que las bacterias presentes en el tracto reproductivo, se clasifican en cuatro grupos: bacterias Gram

positivas, Gram negativas, acido-alcohol resistente y bacilos espora formadores.

a. Bacterias Gram positivas

Streptococcus sp.- Las enfermedades reproductivas postparto causadas por esta bacteria comprometen la eficiencia reproductiva, debido a la persistencia de una inflamación moderada en las paredes musculares del útero o el retraso de la involución uterina (Fernández *et al.*, 2006; Rodríguez 2002; Palmer, 2008a).

Lactobacillus sp.- Son considerados como flora bacteriana normal de la vagina; genera un beneficio para su hospedero, debido a la producción de ácido láctico que reduce el pH, contribuyendo a la disminución y retraso del crecimiento de otro tipo de flora potencialmente patógena (Fernández *et al.*, 2006; Vadillo *et al.*, 2002). En la actualidad esta bacteria es usada como probiótico para la prevención de algunas infecciones reproductivas en diferentes animales (Otero *et al.*, 1998).

b. Bacterias Gram negativas

Escherichia coli. Es un contaminante del tracto genital que se puede aislar unos días después del parto, con un porcentaje del 36% el cual se ha relacionado con contaminación de los machos (Rodríguez, 2002).

Klebsiella sp.- Se clasifica como flora uterina normal en novillas (Gonzales *et al.*, 2007).

Prevotella melaninogenica.- Microorganismo patógeno, causante de problemas reproductivos e infecciones en el tracto urogenital de los bovinos, asociada principalmente con infecciones causadas por *E. coli* (Sheldon *et al.*, 2008) y *A. pyogenes* el cual incrementa el riesgo y la severidad de la endometritis en bovinos (Sheldon *et al.*, 2008). Estudios realizados en Londres, reportan que el crecimiento de esta bacteria se ve estimulado por la producción de estradiol que es secretada en la ovulación, por lo que puede facilitar la presentación de problemas reproductivos como reabsorción embrionaria, metritis, endometritis y abortos, entre otras (Sheldon y Dobson, 2004).

c. Bacterias ácido-alcohol resistente

Arcanobacterium pyogenes (Corynebacterium-Actinomyces pyogenes).- Aunque es reconocido como ácido-alcohol resistente, de acuerdo con la tinción de Gram, se clasifica como Gram positivo. Se considera como habitante normal de mucosa vaginal y prepucial en los rumiantes, aunque se ha encontrado relacionado con problemas reproductivos como aborto (Arainga *et al.*, 2003). Investigaciones realizadas en Iraq, reportaron que esta bacteria puede alojarse hasta 21 días post parto, generando una severa endometritis, lo que usualmente termina en infertilidad (Azawi, 2008).

d. Bacterias bacilos espora formadores

Clostridium sp.- Las esporas liberadas por este microorganismo poseen elevada resistencia a los cambios ambientales, lo que les permite mantener su

potencial infeccioso (Palmer, 2008b; Moat y Foster, 1988). Los problemas reproductivos que se asocian con esta bacteria son la metritis tóxica, gangrenosa e incluso puede llegar a generar la muerte del animal (Palmer, 2008a).

2.4.5. Signos clínicos y lesiones

Generalmente las hembras con endometritis no llegaran a preñar o presentan bajas tasas de preñes como se observó en un estudio en vacas donde la tasa de preñez se redujo en un 27% (LeBlanc *et al.*, 2002), en vacas. A pesar de que los signos clínicos no se acercan mucho al diagnóstico de endometritis, el diagnóstico definitivo se puede realizar mediante la ecografía que nos permite observar la acumulación de líquido en la cavidad uterina y el engrosamiento del útero (Tibary *et al.*, 2001); también se puede realizar el diagnóstico definitivo mediante la citología endometrial por la presencia de células inflamatoria (neutrófilos) que son las primeras células que responden ante un estímulo antigénico, por lo tanto son un buen indicador de un proceso inflamatorio agudo del endometrio (Katila, 1995).

2.5. Técnicas de diagnostico

Peso *et al.* (2014), indican que la endometritis subclínica es difícil de diagnosticar en el campo por falta de síntomas clínicos. Pero que para su diagnóstico definitivo se puede utilizar la técnica de citología uterina, ultrasonografía, vaginoscopia y palpación rectal.

A continuación, se detallan algunas técnicas utilizados para el diagnóstico de endometritis subclínica.

2.5.1. Citología uterina

El examen citológico del contenido uterino es una forma rápida y barata para verificar la naturaleza de cualquier fluido presente y para determinar la presencia de células inflamatorias (Tibary y Anouassi, 2001); es una prueba confirmatoria más empleada para el diagnóstico de las infecciones uterinas (Tibary y Anouassi, 2001; Dubuc *et al.*, 2010). Por medio de esta prueba podemos conocer el porcentaje de células inflamatorias presente en el útero, lo cual es un indicativo directo de una posible infección (Barlund *et al.*, 2008). Las muestras para citología pueden ser tomadas principalmente por medio de dos técnicas: lavaje uterino (Gilbert *et al.*, 2005; Tibary y Anouassi, 2001) y Cito cepillo (Kasimanickam *et al.*, 2004, 2005; Tibary y Anouassi, 2001)

2.5.1.1. Cito cepillo

Utilidad del cito cepillo

El cito cepillo es el método más preciso para el diagnóstico de endometritis (Barlund *et al.*, 2008), debido a que ésta es una técnica más consistente y un método fiable (Kasimanickam *et al.*, 2005), y además se caracteriza por ser rápida, específica, sensible y económica, lo que le hace una herramienta valiosa para la investigación sobre el rol y la importancia de la endometritis (Gilbert *et al.*, 2005).

Técnica de cito cepillo

La recolección de células del útero se realiza utilizando un cito cepillo modificado, donde el cito cepillo es recortado 3 a 4 cm por detrás del cepillo, éste extremo es insertado en una varilla de acero inoxidable (65 cm de longitud, 4 mm de diámetro exterior) el cual es cubierto con una funda comúnmente utilizada en la inseminación artificial de vacunos y protegido con una camiseta sanitaria. El cito cepilló pasa a través de la vagina y el cuello uterino. En el orificio externo del cuello uterino, el conjunto cito cepillo – funda perforan la camiseta sanitaria y una vez en el cuerpo del útero el cito cepillo es extraído de la funda, el citocepillo se gira hacia la derecha e izquierda aproximadamente un cuarto de vuelta para obtener material celular adyacente del endometrio; terminados los giros el cito cepillo es introducido nuevamente dentro de la funda de plástico antes de ser retirado del útero, terminada la toma de muestras se retira el dispositivo del tracto reproductivo del animal y el cito cepillo es rodado sobre un portaobjetos de vidrio y se deja secar al medio ambiente (Dubuc *et al.*, 2010; Barlund *et al.*, 2008; Kasimanickam *et al.*, 2004). Las muestras de citología son preferentemente tomadas cuando la hembra está receptiva y el cuello del útero esta relajado y abierto (Barlund *et al.*, 2008; Tibary y Anouassi, 2001).

En el caso de camélidos un 3 – 5% de PMN por campo es usualmente un indicativo de que las hembras tienen endometritis (Tibary y Anouassi, 2001).

2.5.1.2. Lavado uterino

Utilidad del lavado uterino

Se ha demostrado que la acumulación de fluido intrauterino se asocia con el crecimiento bacteriano y la involución uterina retardada (Mateus *et al.*, 2002); En éste fluido uterino es común encontrar predominantemente los polimorfo nucleares (PMN), por lo cual la determinación de la proporción relativa de éste tipo de células es utilizada como un método predictivo para la determinación de la endometritis y consecuentemente también permite estimar la capacidad y desempeño reproductivo de la hembra en el post parto (Gilbert *et al.*, 2005; Kasimanickam *et al.*, 2004).

La técnica de lavado útero es la mejor, pero tiene la desventaja de tener un procedimiento largo (Tibary y Anouassi, 2001); otro inconvenientes es que puede existir un porcentaje de fracasos como consecuencia de la imposibilidad en la recuperación del líquido utilizado para lavar el útero y el número de células encontradas puede no reflejar la proporción real de PMN, pero como ventaja es que los materiales necesarios para realizar este procedimiento son fáciles de conseguir (Kasimanickam *et al.*, 2005).

Técnica de lavado uterino

La técnica consiste en infundir en el útero 20mL de solución salina estéril (cloruro de sodio 0,9%), luego se realiza masajes del útero durante 5-10 segundos por palpación rectal, pasado éste tiempo se realiza la aspiración de al menos 2 ml del fluido infundido. El fluido recuperado se transfiere a un tubo estéril de plástico y se coloca en el hielo o en un pequeño refrigerador.

Una vez en el laboratorio, se centrifugan las muestras de lavado a 600 x g usando una centrífuga convencional durante 15 min. El sobrenadante se retira y el sedimento restante se re suspende en una pequeña cantidad del líquido sobrenadante del lavado, a continuación se realiza un frotis en una lámina portaobjetos y se deja secar al aire, una vez secas las láminas son teñidas con Wright – Giemsa, las láminas son leídas haciendo uso de un microscopio óptico a un aumento de 40X, contando un mínimo de 100 células endometriales entre PMN y células de descamación (Gilbert *et al.*, 2005; Barlund *et al.*, 2008; Palmer, 2006), evaluando también la morfología de los PMN; en el caso de camélidos un 3 – 5% de PMN por campo es usualmente un indicativo de que las hembras tienen endometritis (Tibary y Anouassi, 2001).

Según Tibary y Anouassi (2001); indican que el útero se vacía con una pequeña cantidad de solución salina estéril usando un catéter Foley o pipeta de inseminación para yegua, el fluido se colecta, se fija en etanol al 40% y se centrifuga para concentrar las células. Los frotis son preparados a partir del sedimento, y secado al aire.

2.6. Técnica de tinción

2.6.1. Tinción Diff-Quik

La tinción Diff quik es un tipo de tinción policromica del tipo Romanowsky, este tipo de tinción es de elección para el uso rutinario del diagnóstico citológico, debido a su simplicidad y rapidez (Vasquez *et al.*, 2000); esta tinción consta de un fijador (alcohol) y dos tipos de colorantes (eosina y azul

de metileno); el fijado en alcohol se realiza en 15 segundos para luego ser secada al medio ambiente y ser sumergida en el primer colorante por un tiempo de 15 segundos y secado al medio ambiente por último se sumerge en el segundo colorante por 15 segundos y es lavado con agua destilada para luego ser secada al medio ambiente (Borras, 2012).

Kasimanickam *et al.* (2004), indican que las muestras obtenidas por citocepillo se pueden colorear utilizando la tinción 15 (Diff-Quik)

2.6.2. Tinción Giemsa

Es un tipo de tinción policromática que se utiliza en la tinción de células sanguíneas y cuyo procedimiento es el siguiente; primeramente se realiza el fijado con una solución de alcohol metílico por un tiempo de 3 minutos, luego se seca al medio ambiente para ser sumergido en el colorante Giemsa diluido (un volumen de colorante para nueve a quince volúmenes de agua o de amortiguador de pH 6.8), se sumergirá en esta solución por un tiempo de 15 minutos a una hora; luego será lavada con agua destilada y secada al medio ambiente (Lynch *et al.*, 1987).

Kasimanickam *et al.* (2004), indican que las muestras obtenidas por citocepillo se pueden colorear utilizando la tinción Giemsa.

2.7. Ultrasonografía

Para comprender los usos de la ultrasonografía resulta elemental conocer los principios básicos de la propagación e interacción de las ondas ultrasónicas con los diferentes tejidos; las características de la imagen, dependen de la densidad y

organización de los tejidos y órganos, así por ejemplo el aire y los líquidos no reflejan o reflejar poco las ondas ultrasónicas, que se ven en la pantalla de color negro, en cambio los tejidos más densos reflejan la mayoría de dichas ondas y se visualizan de color gris o blanco y de acuerdo a la habilidad de los tejidos de reflejar el haz de ultrasonido o dicho en términos técnicos ecogenicidad (Sánchez y Alfonso, 2000).

La terminología para interpretar una imagen ecográfica según Sanchez y Alonso (2000) es la siguiente:

Hiperecogenico: se refiere a la imagen producida por órganos que reflejan todo o casi todo el haz de ultrasonido que incide sobre ellos y se observan blancos en la pantalla del monitor. Ejemplo. Tejido óseo, tejido fibroso, cálculos, calcificaciones.

Hipoecogenico: son la imágenes originadas por tejidos blandos que por su ecotectura, reflejan parcialmente el haz de ultrasonido produciendo ecos de menor intensidad, los cuales va a originar `puntos menos brillantes para mostrar una escala de grises en la pantalla. Ejemplo. Tejidos parenquimatosos.

Anecogenico: son imágenes producidas por estructuras que no reflejan si no que transmiten las ondas incidentes. Se observan negras en la pantalla. Ejemplo. Vejiga, quistes, folículos ováricos.

2.7.1. Utilidad de la ultrasonografía

La ultrasonografía es una técnica de diagnóstico de la endometritis subclínica aunque en menor uso (Barlund *et al.*, 2008; Kasimanickam *et al.*, 2004). La exploración por ultrasonido de tiempo-real y de modo-B ha demostrado ser una técnica muy útil para la evaluación de la situación reproductiva en camélidos.

Actualmente, los principales usos de esta técnica son: la evaluación del tracto reproductivo, la dinámica folicular y la evaluación uterina (Parraguez *et al.*, 2010); y en algunos casos, la ecografía nos muestra la acumulación de líquido en la cavidad uterina o líquido intrauterino que está asociado con la endometritis y ofrece la ventaja de realizar un diagnóstico inmediato (Kasimanickam *et al.*, 2005; Dhaliwal *et al.*, 2001; Tibary *et al.*, 2001; Mateus *et al.*, 2002); además, con la ecografía se puede identificar y observar tres imágenes de cortes transversales separados y se utiliza para calcular el grosor endometrial o engrosamiento de la pared uterina, y el diámetro luminal del útero (Barlund, *et al.*, 2008; y Tibary *et al.*, 2001).

2.7.2. Técnica de ultrasonografía

Las llamas y alpacas generalmente suelen ser dóciles a un examen ecográfico. El examen del aparato reproductivo puede hacerse transrectal o transabdominal, pero el enfoque es preferible transrectal. El examen generalmente se realiza con el animal retenido de forma manual o en la manga y puede hacerse con el animal en posición de pie o reclinada. La sonda se puede introducir en el recto con una mano enguantada como en palpación

transrectal, en la mayoría de las alpacas adultas sobre todo si son multíparas. Sin embargo, en hembras jóvenes o pequeñas, el espacio pélvico intrarectal puede ser demasiado pequeña para la colocación de la mano del examinador, por eso el uso de una extensión de la sonda rígida es muy eficaz (por ejemplo, un tubo PBC de 2,0 a 2.5 cm de diámetro y 40 cm de longitud). Antes de introducir la sonda en el recto, esta debe ser lubricada utilizando gel ecográfico (Parraguez *et al.*, 2010). La ecografía trans-rectal se puede realizar utilizando un transductor lineal de 7.5MHz montado sobre una varilla de extensión para permitir la manipulación sin la inserción de la mano al recto; para lo cual: digitalmente se realiza el vaciado de la cavidad rectal, el transductor debe ser lubricado con 60mL de infusión y después ser introducido suavemente en la cavidad rectal (Tibary y Aunoassi, 1996).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. **Ámbito de estudio**

El presente estudio fue conducido en el Centro de Investigación y Producción (CIP) Chuquibambilla, conducido por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano. Ubicado en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar en el departamento de Puno, en las coordenadas geográficas 14°47'37" latitud sur y 70°47'50" longitud oeste, a la altura del Km 1200 de la carretera Puno – Cusco y a una altitud de 3974m.s.n.m. Climatológicamente pueden ser observadas dos estaciones bien definidas, la estación lluviosa que comprende los meses de noviembre a abril, caracterizada por una precipitación pluvial de 690.5mm, con temperaturas moderadas durante el día y la noche teniendo en promedio 8.60°C, con una humedad relativa de 67.8% y la estación de estiaje que comprende los meses de mayo a octubre, caracterizada por la ausencia de lluvias teniendo una precipitación pluvial promedio de 82.8mm, ambiente seco, bajas temperaturas, cielo despejado, gran iluminación diurna y noches bastante frías, la temperatura promedio es de 5.07°C y la humedad relativa 56.9% (SENAMHI, 2014; Martinez, 2014).

3.2. Duración del estudio

El presente estudio fue realizado en los meses de enero a marzo del año 2016, período durante el cual se tomaron las muestras de citología uterina.

3.3. Material experimental

3.3.1. Animales

Se utilizaron 39 alpacas hembras de la raza Suri del color blanco, las que fueron evaluadas por citología endometrial y ultrasonografía 21 días después del parto, de las cuales 19 alpacas fueron múltiparas (01 alpaca se descartó por presentar secreción uterina) y 20 fueron primíparas.

Todas las hembras fueron mantenidas en sus respectivos rebaños bajo las mismas condiciones de manejo propias del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla. Los animales fueron pastoreados en praderas naturales desde las 7:00 de la mañana hasta las 4:30 de la tarde aproximadamente y su acceso al agua fue *ad libitum*.

3.3.1.1. Distribución de los animales

La distribución de los animales según el número de partos y técnica de diagnóstico en el presente estudio, se presenta en el cuadro 1:

Cuadro 1. Distribución de los animales según el número de partos, técnica de diagnóstico y tipo de tinción.

N° de Parto	Primíparas		Múltiparas	
	Cito cepillo	Lavaje uterino	Cito cepillo	Lavaje uterino
n	10	10	10	9

La ultrasonografía se realizó en todos los animales antes de obtener las muestras de citología endometrial.

Las dos técnicas de tinción fueron empleadas en todas las muestras, en razón a que se prepararon muestras por duplicado de cada animal.

3.3.2. Materiales

3.3.2.1. Material de laboratorio.

- Gel ecográfico.
- Alcohol de 90°
- Torundas de algodón
- Fosfato buffer salino (PBS)
- Tubos cónicos de 15 ml
- Fundas de inseminación artificial
- Aplicador de Cassou 0.25
- Cito cepillos
- Jeringas de 20mL, 10mL y 5mL
- Sondas de Foley 14Fr
- Camisetas sanitarias
- Láminas porta objetos
- Batería de tinción Diff Quik
- Batería de tinción Giemsa
- Puntas para micropipetas
- Pipetas de transferencia

3.3.2.2. Equipos.

- Ecógrafo portátil WED 3100 con un transductor rectal de 6.5 Mhz.
- Centrífugadora Spin Plus, con una velocidad máxima de 5000rpm, tiempo de aceleración y frenado a velocidad máxima de 20 s.
- Microscopio óptico.

3.3.2.3. Material de campo.

- Máquina fotográfica
- Lapiceros
- Cuaderno de campo
- Marcador indeleble
- Caja de transporte
- Gradilla para tubos
- Tablero
- Sogas
- Mechero de alcohol

3.3.2.4. Otros materiales.

- Tijeras quirúrgicas
- Pinza simple
- Guantes de látex
- Guantes obstétricos
- Algodón
- Papel aluminio
- Papel toalla

- Puntas para micropipetas: 10, 100, 1000 uL

3.4. Metodología

3.4.1. Toma de muestras de citología uterina

3.4.1.1. Técnica del cito cepillo (*Cytobrush*)

La realización de la técnica requirió de la adaptación de los protocolos desarrollados por Kasimanickam *et al.* (2004); Kasimanickam *et al.* (2005) y Pascottini *et al.* (2015), con el fin de realizar el mismo procedimiento en todos los animales todas las veces, el cual se describe a continuación:

a) Preparación del citocepillo

- Citocepillos de uso humano (Jiangsu Yada Technology Group Co., Ltd) fueron utilizados, los cuales fueron cortados procurando que tuvieran una longitud de 5cm, sin ser retirados de su envoltura original.
- Haciendo uso de un mechero se calentó la punta del mandril del aplicador de Cassou de 0.25, una vez caliente se hizo coincidir el extremo cortado del cepillo con la punta caliente del mandril y por presión suave se insertó el cepillo en el mandril y se esperó a que enfriará.
- Una vez fijado el cepillo a la punta del mandril, se insertó el conjunto dentro de una funda de inseminación artificial y se cubrió con una camiseta sanitaria, quedando lista para ser utilizada.

b) Preparación del animal para el muestreo

- La hembra fue sujeta en posición decúbito ventral sobre una tarima diseñada para este fin, una vez que el animal estuvo fijada sobre la tarima un auxiliar sujeto al animal suavemente por el cuello.

- Con la mano enguantada y adecuadamente lubricada se procedió con el vaciado de las heces del recto del animal.
 - Se realizó la higiene de la región perianal con abundante agua, secada con papel toalla y desinfectada por aspersion con alcohol de 96°.
- c) Toma de muestra con citocepillo**
- Con la mano cubierta por un guante obstétrico y adecuadamente lubricado, se insertó la mano suavemente por el recto del animal, realizando la palpación de tracto reproductivo de la hembra.
 - Para la toma de muestras, se insertó el citocepillo previamente preparado por la vagina del animal, una vez que el extremo anterior del dispositivo se puso en contacto con la cérvix se retiró la camiseta sanitaria por tracción simple en sentido contrario, se hizo pasar el dispositivo a través de la cérvix, una vez en la luz del cuerno uterino con mayor diámetro se liberó el cepillo de la funda y se hizo dar un giro completo (360°) en el sentido de las agujas del reloj, con la finalidad de que los bordes del cepillo tomarán las células del epitelio uterino, terminado éste procedimiento se introdujo nuevamente el cepillo dentro de la funda y se retiró del tracto reproductivo del animal.
 - Una vez que el dispositivo estuvo fuera se volvió a exponer el cepillo y se hizo rodar muy suavemente sobre una lámina porta objetos la cual se encontraba rotulada con el número de arete del animal.
 - Se dejó secar la lámina a medio ambiente, una vez seca fue colocada en una caja porta láminas y transportada hasta el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla; donde fue coloreada y luego leída. Dos láminas fueron

preparadas de cada animal para ser sometidas a cada una de las dos tinciones (Diff-Quik y Giemsa).

3.4.1.2. Técnica de lavado uterino

Para realizar la toma de muestras por lavado uterino se realizó la adaptación de los protocolos desarrollados por Gilbert *et al.* (2005); Kasimanickam *et al.* (2005) y Dini *et al.* (2015)

a) Preparación del catéter para lavado uterino

- Una sonda de Foley14Fr estéril fue utilizada para realizar el lavado uterino; para dar rigidez a la sonda de Foley se utilizó el mandril del aplicador de Cassou 0.25, el cual fue previamente desinfectado con alcohol de 96°, se introdujo el mandril dentro de la sonda de Foley y luego el conjunto fue cubierto por una camiseta sanitaria, quedando listo para ser empleado.

b) Preparación del animal

- La hembra fue sujeta en posición decúbito ventral sobre una tarima diseñada para este fin, una vez que el animal estuvo fijada sobre la tarima un auxiliar sujeto al animal suavemente por el cuello.
- Con la mano enguantada y adecuadamente lubricada se procedió con el vaciado de las heces del recto del animal.
- Se realizó la higiene de la región perianal con abundante agua, secada con papel toalla y desinfectada por aspersion con alcohol de 96°.

c) Toma de muestra por lavado uterino

- Se realizó la fijación de la cérvix por palpación rectal, para ello se introdujo la mano izquierda cubierta por un guante obstétrico y adecuadamente lubricada con aceite mineral.
- Para la toma de muestras, se introdujo la sonda de foley previamente preparado por la vagina, y una vez que el extremo anterior de la sonda se puso en contacto con la cérvix se retiró la camiseta sanitaria por tracción simple en sentido contrario, se hizo pasar la sonda a través de la cérvix, una vez que la sonda de Foley se ubicó en el cuerpo del útero fue fijada.
- Para fijar la sonda de Foley en el útero, se insufló con aire su balón de goma haciendo uso de una jeringa de 5mL, se comprobó que la sonda estuviera fija por tracción ligera en sentido contrario.
- Comprobada la fijación de la sonda de Foley se retiró el mandril del catéter y se procedió a realizar el lavaje uterino.
- Para realizar el lavaje uterino 15mL de fosfato buffer salino (PBS; Sigma P3813) fueron infundidos dentro de la cavidad uterina, se realizó un suave masaje de los cuernos uterinos y luego se procedió a recuperar el líquido infundido.
- El líquido fue recuperado en un tubo cónico de 15mL de capacidad, fue determinada la cantidad de volumen recuperado y finalmente el tubo cónico fue colocado en una gradilla para ser transportado al laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla.

d) Procesamiento de la muestra de lavado uterino

- Antes de realizar la centrifugación las muestras fueron balanceadas haciendo pares de similar contenido.
- La centrifugación se realizó con la centrifugadora Spin Plus a 600 x g por 15 minutos.
- Terminado el tiempo de centrifugación se decantó el líquido y el pellet obtenido fue reconstituido con 1000uL de PBS por pipeteo constante.
- Para realizar el frotis, 10 uL de la muestra fueron colocados sobre una lámina porta objetos previamente rotulada con el número del animal; a continuación se realizó el frotis, para ello se colocó el extremo de otra lamina en un ángulo de 30° aproximadamente, se deslizó suavemente la lámina y se obtuvo el frotis, el cual fue secado a temperatura ambiente, una vez seco fue sometido al procedimiento de tinción. Dos láminas fueron preparadas de cada animal para ser sometidas a cada una de las dos tinciones (Diff-Quik y Giemsa)

3.4.2. Tinción de muestras de citología uterina**3.4.2.1. Tinción Diff Quik**

Se realizó utilizando el procedimiento reportado por Pascottini *et al.* (2015), con algunas modificaciones, brevemente el protocolo es como sigue:

- El kit de tinción se encuentra compuesto por una batería de tres soluciones: solución A, fijadora; solución B, roja y solución C, azul. Cada una de las soluciones fue vertida en cajas de tinción para láminas.
- Una vez secas las láminas fueron sumergidas en la solución A por espacio de 10 segundos, pasado el tiempo la lámina se dejó secar al

medio ambiente (18°C aproximadamente), una vez seca la lámina fue sumergida en la solución B por espacio de 15 segundos, terminado este procedimiento las láminas fueron sumergidas en la solución C por espacio de 15 segundos, terminado este proceso las láminas fueron lavadas con agua destilada haciendo uso de una pipeta de transferencia de 3mL.

- Las láminas se dejaron secar al medio ambiente y luego fueron almacenadas en una caja porta láminas para su posterior lectura.

3.4.2.2. Tinción Giemsa

- Una vez secas las láminas estas fueron fijadas en una solución de PBS con 4% de paraformaldehído por espacio de 10 minutos, terminada la fijación las láminas fueron lavadas en agua corriente y luego secadas al medio ambiente (18°C aproximadamente).
- Una vez que las láminas secaron, fueron sumergidas en una solución Giemsa al 20% donde permanecieron por espacio de 60 minutos, terminado el proceso de tinción las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente.
- Finalmente fueron almacenadas en una caja porta láminas hasta su posterior lectura.

3.4.3. Lectura de las láminas

La lectura de las láminas se realizó haciendo uso de un microscopio óptico con el procedimiento siguiente:

- Las láminas fueron montadas en la platina del microscopio, se ubicó al azar el campo de lectura utilizando el objetivo de menor potencia (10X).
- Una vez fijado el campo, se utilizó el objetivo de 40X para realizar la lectura de la lámina.
- La lectura consistió en evaluar 100 células, entre células uterinas y polimorfo nucleares. Terminada la lectura se estableció el porcentaje de polimorfo nucleares con la siguiente fórmula:

$$\% PMN = \frac{PMN \text{ contados}}{\text{Número total de células contadas}} \times 100$$

3.4.4. Ultrasonografía

El ultrasonido de las hembras fue realizado haciendo uso de un equipo de ultrasonido portátil (WED 3100) aplicando la metodología descrita por Kasimanickam *et al.* (2004), con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

- Se sujetó a la alpaca en posición decúbito ventral y se la fijo en una tarima diseñada para este fin, una vez que el animal estuvo bien sujetado se procedió con el vaciado de las heces.
- Se preparó el transductor lineal del equipo de ultrasonido, para ello éste fue cubierto con gel y protegido con una camiseta sanitaria.
- Una vez preparados el animal y el equipo de ultrasonido, se introdujo la mano enguantada y adecuadamente lubricada, junto con el transductor lineal por el recto del animal.
- Una vez que el transductor se encontró dentro del recto, se realizaron suaves movimientos laterales con el transductor observando en todo momento la imagen proyectada en la pantalla del equipo de ultrasonido.

- Ubicados los cuernos uterinos se c6gelo la imagen y se realiz6 la medici6n del di6metro de los cuernos uterinos con la opci6n measure del mismo. Las medidas fueron tomadas entre 3 y 5cm de distancia respecto de la curvatura de los cuernos uterinos y luego fueron registradas en el cuaderno de campo.

3.5. An6lisis estadístico

La variable continua de di6metro uterino fue analizada haciendo uso de un Diseño Completo al Azar (DCA) con un arreglo factorial 2x2, tomando 2 niveles para el factor n6mero de parto y 2 niveles para el factor cuernos uterinos, cuyo modelo matem6tico es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + p_i + c_j + (pc_{ij}) + e_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = Variable respuesta (di6metro, mm)

μ = Efecto de la media poblacional.

p_i = Efecto del i-6simo nivel del factor parto (prim6para y m6ltipara)

c_j = Efecto del j-6simo nivel del factor cuerno uterino (derecho e izquierdo)

(pc_{ij}) = Efecto de la interacci6n del i-6simo nivel del factor parto con el j-6simo nivel del factor cuerno uterino.

e_{ijk} = Error experimental.

Todas las variables que tuvieron valores porcentuales como son el porcentaje de neutr6filos, fueron primeramente convertidos a valores angulares usando la transformaci6n Arco seno, con la f6rmula siguiente:

$$b_{ij} = \frac{2}{\pi} \times \arcseno(\sqrt{x_{ij}})$$

Una vez transformados los valores fueron sometidos a la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad y homoscedasticidad con un 95% de confianza, a continuación los resultados fueron analizados haciendo uso de un diseño completo al azar con un arreglo factorial 2x2, para el análisis de las técnicas de toma de muestras se tomó 2 niveles para el factor número de partos y 2 niveles para el factor técnica de toma de muestras; mientras que, para el análisis de la técnica de tinción se tomó 2 niveles para el factor número de partos y 2 niveles para el factor técnica de tinción, cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + p_i + t_j + (pt_{ij}) + e_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} = Variable respuesta (porcentaje de neutrófilos)

μ = Efecto de la media poblacional.

p_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor parto (primípara y múltipara)

t_j = Efecto del j-ésimo nivel del factor técnica o tinción (cito cepillo y lavaje; Diff Quik y Giemsa)

(pt_{ij}) = Efecto de la interacción del i-ésimo nivel del factor parto con el j-ésimo nivel del factor tinción.

e_{ijk} = Error experimental.

La diferencia de medias se realizó mediante la prueba de Tukey, el nivel de significancia utilizado para determinar la diferencia significativa fue $p < 0.05$. Todos los procedimientos fueron realizados con el paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc., 2013)

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la técnica de muestreo de citología uterina en el diagnóstico de endometritis en alpacas

En la tabla 1, se muestran los resultados del porcentaje de neutrófilos encontrados al realizar la lectura de las láminas que contenían las muestras de citología endometrial obtenidas haciendo uso de dos técnicas de muestreo (citocepillo y lavado uterino). El porcentaje de neutrófilos hallado en las muestras tomadas con la técnica de cito cepillo fue de 18.54% significativamente superior ($P < 0.01$) con respecto a la técnica de lavado uterino en la que se observó un 4.48% de neutrófilos, sugiriendo ello que la técnica de citocepillo podría ser una prueba más eficaz en el diagnóstico de endometritis subclínica de alpacas en el pos parto (anexo, tabla 2 y 3).

Tabla 1. Técnicas de diagnóstico por citología uterina

Técnica de diagnóstico	Neutrófilos (%)	Valores extremos
Cito cepillo	18.54 ^a	0.00 - 56.63
Lavaje uterino	4.48 ^b	0.00 - 30.41

^{a,b} Letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($P < 0.01$)

En el presente experimento el uso del cito cepillo resultó ser un mejor método de diagnóstico, resultado que también fue hallado por Barlund *et al.* (2008), quienes evaluaron la efectividad de las dos técnicas de diagnóstico en un estudio realizado en vacas y mencionan que la técnica de cito cepillo es el método más preciso para el diagnóstico de endometritis, debido a que se obtiene no sólo un mayor número de células sino también muy bien preservadas en cada muestra, lo que hace de ésta una prueba de gran confianza y de resultados repetibles, tanto para tomar muestras

de cérvix como para tomar muestras de pared uterina (Kasimanickam *et al.*, 2005); en comparación con la técnica de lavado uterino donde se obtuvieron porcentajes muy bajos de neutrófilos en el presente estudio, por lo cual no sería una prueba muy fiable y requeriría de mayor investigación, debido a que la técnica de lavado uterino tiene por ventaja la recuperación de células de una gran superficie de área de la luz uterina y por ende podría proveer una muestra más representativa del contenido uterino (Bonnett *et al.*, 1991; Kasimanickam *et al.*, 2005).

Tal como en otras especies, el lavado uterino es una técnica que requiere de mayor investigación mucho más en la alpaca, pues éste es el primer estudio que utiliza la técnica de lavado uterino para la evaluación de citología endometrial, siendo por ende conveniente realizar más investigación respecto de los volúmenes de medio infundido en el útero para realizar el lavado, las velocidades utilizadas al momento de realizar la centrifugación y el tiempo de centrifugación, pues al parecer son estas variables las que tienen una gran influencia sobre los resultados encontrados en un diagnóstico de endometritis por la técnica de lavado, tal como lo observaron Kasimanickam *et al.* (2005) y Gilbert *et al.* (1998), cuando realizaron la validación de la técnica de lavado uterino para el diagnóstico de la endometritis en vacas.

No hubo dificultad en la toma de muestras entre la técnica de cito cepillo y lavado uterino, ambas se realizaron de manera eficiente y muy rápida en todos los animales muestreados, la recuperación del líquido infundido fue muy buena en todos los animales, contrario a lo observado por Kasimanickam *et al.* (2005) y Gilbert *et al.* (1998). Pero si hubo un inconveniente con la técnica de lavado uterino, que fue observado al momento de realizar el frotis, debido a que no fue posible realizar un

frotis homogéneo sobre la lámina, lo cual dificultó las lecturas de las mismas; tal vez, esta sea una de las razones por la cual se contaron pocos neutrófilos en las muestras obtenidas por el método de lavado uterino.

4.2. Evaluación de la técnica de tinción usada en la determinación de endometritis

Todas las muestras de citología endometrial fueron sometidas a los dos tipos de tinción (Diff Quik y Giemsa) como se muestra en la tabla 2, sin diferencia significativa entre el porcentaje de neutrófilos hallados en las láminas teñidas con Diff Quik, que fue en promedio 11.38%, similar al porcentaje hallado en las láminas teñidas con Giemsa en las que se observó en promedio un 12.73% de neutrófilos. Lo que permitiría afirmar que la tinción de las muestras de citología endometrial podría ser realizada por cualquier método tal como lo afirma Kasimanickam *et al.* (2004).

Tabla 2. Técnicas de tinción para la evaluación de citología uterina.

Técnica de diagnóstico	Neutrófilos (%)	Valores extremos
Diff Quik	11.38	0.00 - 56.63
Giemsa	12.72	0.00 - 69.42

Según los resultados observados en el presente experimento ambas técnicas de tinción permitieron observar similares porcentajes de neutrófilos, respecto de la calidad ambas técnicas también fueron eficientes, por lo que podrían ser utilizadas para la evaluación de citología endometrial en alpacas, tal como lo realizan en la evaluación de la endometritis en otras especies (Gilbert *et al.*, 2005; Melcher *et al.*, 2014; Pascottini *et al.*, 2015, Pascottini y Opsomer, 2016). Sin embargo, la técnica de tinción Diff Quik (Wright – Giemsa modificada) sería más útil, debido a que es

una técnica sencilla, práctica y no requiere de mucho tiempo para realizarla y según la referencia de la literatura más del 90% de los estudios usan esta técnica por la practicidad y fiabilidad de la misma (Pascottini *et al.*, 2015).

Un método de tinción de alta calidad es primordial para producir una evaluación objetiva y de precisión de la relación entre los neutrófilos y las células endometriales en las muestras de citología uterina; sin embargo, el método de tinción Giemsa ampliamente utilizado para la evaluación de citología endometrial (Pascottini *et al.*, 2015); no resultó ser práctico en el presente estudio pues este procedimiento fue muy extenso y laborioso; además los resultados obtenidos con ésta técnica de tinción no fueron estadísticamente diferentes respecto de la técnica de tinción Diff Quik, la cual no sólo fue muy fácil de implementar, sino que además fue la que requirió el menor tiempo para la preparación de las láminas de citología endometrial, siendo por tanto un método de tinción muy eficiente en la evaluación de la citología endometrial, tal como lo ha demostrado Pascottini *et al.* (2015), al comparar el porcentaje de neutrófilos en las muestras de citología endometrial coloreadas con Diff Quik versus el Naphthol-AS-D-cloroacetato-estearasa (CIAE), una preparación histoquímica considerada como la mejor coloración estándar para colorear polimorfo nucleares, frente a la cual la tinción Diff Quik ha demostrado tener una buena correlación de concordancia, lo que le confiere un estándar de alta calidad para la identificación y conteo de células de citología endometrial (Overbeck *et al.*, 2013; Pascottini *et al.*, 2015)

4.3. Evaluación de la ultrasonografía en la determinación de endometritis

Los resultados de la evaluación ultrasonográfica de los cuernos uterinos de alpacas primíparas y multíparas se muestra en la tabla 3. No se observó diferencia

estadística significativa ($p > 0.05$) en el diámetro de los cuernos uterinos de alpacas primíparas y multíparas, en las que el diámetro promedio fue 16.60 ± 3.80 mm y 17.37 ± 4.20 mm, respectivamente.

Tabla 3. Diámetro de cuernos uterinos (promedio \pm DE) evaluados por ultrasonografía

Número de Partos	Diámetro de cuerno (mm)	Valores Extremos	CV %
Primíparas	16.60 ± 3.80	12.00 - 26.00	22.90
Multíparas	17.37 ± 4.20	10.00 - 24.00	24.18

La similitud estadística en el diámetro de los cuernos uterinos entre alpacas primíparas y multíparas podría ser debido a que la involución uterina se encuentra completa antes de los 21 días pos parto y al parecer el número de partos no afecta el tiempo de involución uterina en alpacas primíparas y multíparas (Tibary y Anouassi, 2001; Bravo *et al.*, 1995). La involución uterina completa pudo ser determinada por la ausencia de líquido en la luz uterina (Tibary y Anouassi, 2001), siendo el fluido intrauterino además uno de los principales signos que indican la ocurrencia de endometritis (Tibary y Anouassi, 2001; Mateus *et al.*, 2002; Kasimanickan *et al.*, 2005; Dhaliwal, 2001). Una rápida involución en los camélidos es comparable a las yeguas, lo cual podría ser debido a la separación completa de la placenta durante el parto (Bravo *et al.*, 1995), lo cual facilitaría la expulsión de la placenta y por ende los animales tendrían menos posibilidad de tener una infección uterina que afectaría el tiempo de involución y como tal la ocurrencia de una endometritis (Mateus *et al.*, 2002).

Sin embargo, a la evaluación ultrasonográfica de cada uno de los cuernos uterinos se pudieron observar diferencias significativas en el diámetro de ambos cuernos ($p < 0.05$) siendo mayor el diámetro del cuerno uterino izquierdo que tuvo en promedio 17.90 ± 4.14 mm respecto del cuerno uterino derecho que tuvo 16.05 ± 3.66 mm, estos resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Diámetro de los cuernos uterinos (promedio \pm DE) derecho e izquierdo

Cuerno uterino	Diámetro (mm)	Valores Extremos	CV %
Derecho^b	16.05 ± 3.66	10.00 - 22.00	22.82
Izquierdo^a	17.90 ± 4.14	11.00 - 26.00	23.14

^{a,b}, letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($p < 0.05$)

La evaluación ultrasonográfica permitió establecer el tamaño, consistencia y contenido uterino, observando una diferencia significativa en el diámetro entre los cuernos uterinos derecho e izquierdo tanto en hembras primíparas como en aquellas multíparas. Al parecer el mayor diámetro del cuerno uterino izquierdo no sólo obedecería al hecho de que la gestación en las alpacas se da en el 98% de los casos en ese cuerno uterino (Fernández *et al.*, 1973; Ferrer, 2014; Bravo *et al.*, 1995), sino que esta diferencia en el tamaño de los cuerno uterinos se da desde la etapa fetal en esta especie, así lo demostró un estudio realizado por Mendoza *et al.* (2013), quienes al realizar una evaluación morfométrica de los cuernos uterinos de hembras adultas y fetos hembras, observaron diferencia significativa a favor del tamaño del cuerno uterino izquierdo, tanto en la alpaca como en la llama. Por lo tanto, la

asimetría de tamaño en los cuernos uterinos no debería ser considerada un signo clínico de endometritis.

La evaluación ultrasonográfica en éste experimento, permitió observar además un aspecto importante a considerar respecto del diámetro de los cuernos uterino, pues al parecer esta característica estaría correlacionada con la tasa de preñez en las alpacas, tales resultados se pueden observar en la tabla 5, los mismos que reflejan una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el diámetro de los cuernos uterinos de alpacas que concibieron, las cuales tuvieron un menor diámetro (16.05 ± 4.04) respecto de las alpacas que quedaron vacías (17.95 ± 3.75). Este es un resultado previo que requiere ser investigado a mayor profundidad; sin embargo, podría ya servir como una premisa para seleccionar las hembras que van a ser servidas.

Tabla 5. Diámetro de cuernos uterinos (promedio \pm DE) en alpacas vacías y preñadas

Estado fisiológico	Diámetro (mm)	Valores Extremos	CV %
Preñada ^b	16.05 ± 4.04	10.00 - 25.00	25.20
Vacia ^a	17.95 ± 3.75	12.00 - 26.00	20.89

^{a,b}, letras diferentes en la misma columna difieren significativamente ($p < 0.05$)

Estos resultados no pudieron ser comparados con otros reportes debido a que este es el primer estudio del uso de la ultrasonografía en el diagnóstico de endometritis en alpacas; sin embargo, en otras especies como el vacuno existen algunos reportes que manifiestan que las características del tracto genital pueden tener o no efecto sobre la tasa de preñez (Gilbert *et al.*, 2005; Kasimanickan *et al.*, 2005; Mateus *et al.*, 2002).

Al parecer la evaluación ultrasonográfica del tracto reproductivo de la hembra antes del servicio sería de gran utilidad, así lo demostró Kasimanickam *et al.*, (2005), en un experimento en vacas, quienes observaron que el tamaño de cérvix y útero están asociados con la tasa de preñez, en un experimento en el que utilizaron la ultrasonografía para evaluar la endometritis subclínica. De similar manera, LeBlanc *et al.*, (2002), concluye que el tamaño del útero y cervix en hembras con endometritis subclínica está asociado a una disminución en las tasas de preñez, lo cual podría ser debido a que la endometritis histológicamente es caracterizada por algún grado de alteración en el epitelio superficial, con infiltración de células inflamatorias, congestión vascular, edema del estroma y una variable acumulación de linfocitos y células plasmáticas (Bondurant, 1999), que estarían interfiriendo con una normal implantación y reconocimiento embrionario.

4.4. Diagnóstico de endometritis por citología endometrial y ultrasonografía

El porcentaje de alpacas en post parto que fueron diagnosticadas positivas a endometritis por las técnicas de cito cepillo, lavado uterino y ultrasonografía se muestra en la tabla 6, observándose diferencias significativas entre ellas, siendo superior el porcentaje de alpacas diagnosticadas positivas a endometritis cuando se empleó la técnica de cito cepillo que diagnóstico un 75% de alpacas con endometritis subclínica, seguida por un 48.71% de casos que fueron diagnosticados por la ultrasonografía y la que diagnóstico el menor porcentaje de alpacas con endometritis fue la técnica de lavado uterino con un 21.05%.

Tabla 6. Porcentaje de alpacas diagnosticadas positivas a endometritis

Técnica	Cito cepillo ^a	Lavaje uterino ^c	Ultrasonografía ^b
Endometritis, %	75.00	21.05	48.71

^{a,b,c} letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($p < 0.05$)

En el presente estudio, se diagnosticó como endometritis subclínica cuando se observó más de un 3% de neutrófilos, siendo éste valor el límite mínimo considerado para determinar endometritis subclínica en alpacas (Sandoval *et al.*, 2015; Tibary y Anouassi, 2001).

La sensibilidad entre las diferentes técnicas para el diagnóstico de la endometritis subclínica, fue mayor para la técnica de cito cepillo y menor para la ultrasonografía, resultados que también fueron observados por Gilbert *et al.* (1998, 2005); Sheldon *et al.* (2002) y Barlund *et al.* (2008), quienes encontraron una mayor sensibilidad para el diagnóstico de endometritis subclínica con la técnica de citología endometrial (95%), seguida de la ultrasonografía con 94% de sensibilidad, otras técnicas como vaginoscopia y palpación vaginal tuvieron una sensibilidad del 60% y por último la técnica de palpación rectal tuvo una sensibilidad del 22% para el diagnóstico de endometritis subclínica, lo cual sugiere que la evaluación de la citología endometrial y la ultrasonografía serían las más recomendables para realizar el diagnóstico de endometritis subclínica; sin embargo, estas dos técnicas no estuvieron correlacionadas en el presente estudio ($r = 0.14$), esta falta de correlación entre estas dos técnicas de diagnóstico de endometritis en alpacas parece no sólo darse en esta especie, pues Kasimanickam *et al.* (2005), observaron también una baja correlación entre la citología endometrial y la ultrasonografía ($r=0.28$); así mismo, indican que esta baja relación puede ser consecuencia de que la citología endometrial y la ultrasonografía miden dos factores causales diferentes,

la citología endometrial mide la respuesta celular y la ultrasonografía mide los mecanismos de limpieza del útero.

V. CONCLUSIONES

- La técnica del cito cepillo es la más eficiente en el muestreo de la citología endometrial; además de ser una prueba rápida, específica, sensible y económica para el diagnóstico de endometritis subclínica en alpacas.
- El uso de la tinción Diff Quik o Giemsa son de gran utilidad y generan buenas características respecto de calidad y nitidez de las células, al procesar láminas de muestras de citología endometrial de alpacas para el diagnóstico de endometritis.
- La ultrasonografía es un método que permite la valoración cuantitativa del diámetro de cuernos uterinos, características ecogénicas y presencia de fluido uterino, útiles en el diagnóstico de endometritis subclínica de alpacas.

VI. RECOMENDACIONES

- Usar la técnica de cito cepillo para la obtención de muestras de citología endometrial dado que representa el método más fiable para la evaluación de la endometritis subclínica en alpacas en el pos parto.
- Usar la técnica de tinción Diff Quik para el procesamiento de láminas con muestras de citología endometrial.
- Realizar más investigaciones referentes al uso de la técnica de lavado uterino en la evaluación de la citología uterina para el diagnóstico de endometritis subclínica en alpacas.
- Continuar la investigación sobre el uso de la ultrasonografía como herramienta de diagnóstico de problemas reproductivos y mejora del desempeño reproductivo en alpacas.

VII. REFERENCIAS

- Adams, G., J. Sumar y O. Ginther. 1990. Effects of lactational y reproductive status on ovarian follicular waves in llamas. *J. Reprod. Fertil.* 90: 535-545.
- Araínga, M., N. Sandoval, E. Zacarías y H. Rivera. 2003. *Actinomyces pyogenes* causante de abortos en bovinos. *Rev Investig Vet Perú*; 14(1): 86-88
- Azawi, O. 2008. Review: Postpartum uterine infection in cattle. *Rev Anim Reprod Sci*; 105(3-4): 187-208.
- Barlund, C. S., T. D. Carruthers, C. L. Waldner y C. W. Palmer. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. University of Saskatchewan, Canada.
- Bondurant, R. H. 1999. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J. Anim. Sci.* 77(Suppl. 2):101-110.
- Bonnett, B. N., R. B. Miller, W. G. Etherington, S. W. Martin y W. H. Johnson. 1991. Endometrial biopsy in Holstein -frisian dairy cows I. Technique. Histological criterial and results. *Can J. Vet. Res.* 55: 155-161
- Borras, D. 2012. Citología y patología veterinaria. Introducción a la citología III. <https://patolvet.wordpress.com/2012/06/25/introduccion-a-la-citologia>.
- Bravo, W. y J. Sumar. 1985. Factores que determinan la fertilidad en alpacas. En: Anales de la V Convencion Internacional sobre Camelidos Sudamericanos Organizado por IVITA de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y Universidad San Antonio Abad del Cusco. p. 4.
- Bravo, P., B. Lasley y M. Fowler. 1995. Resumption of ovarian follicular activity y uterine involution in the postpartum llama. *Theriogenology* 44: 783-791.
- Bustinza, A. 2001. La Alpaca. Conocimiento del Gran Potencial Andino. UNA-Puno.

- Del Vecchio, R.P., D.J. Matsas, S. Fortin, D.P. Sponenberg y G.S. Lewis. 1994. Spontaneous uterine infection are associated with elevated prostaglandin F_{2α} metabolite concentration in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 41, 413-421.
- Dhaliwal, G. S., R. D. Murray y Z. Woldehiwet. 2001. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim Reprod Sci.* 67:135–52.
- Dini, P., M. Farhoodi, M. Hostens, M. Van Eetvelde, O. Bogado Pascottini, M. H. Fazeli y G. Opsomer. 2015. Effect of uterine lavage on neutrophil counts in postpartum dairy cows. *Anim. Reproduction Sci.* 158: 25–30
- Dubuc, J., T. Duffield, K. Leslie, J. Walton, S. LeBlanc y G. Risk. 2010. Factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(12):5764-71
- Exelmes, R. 2005. Estudio macro-microscópico de la involución uterina postparto en alpacas. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET.* Vol. VII, N° 07, Julio/2006.
- Fernández, A., E. Silveira y O. López. 2006. Las infecciones uterinas en las hembras bovinas. *REDVET*; 7:1-39.
- Fernandez -Baca S., W. Hansel y C. Novoa. 1970. Embryonic mortality in the alpaca. *Biol Reprod* 3:243–52
- Ferrer, M. S. 2014. Diagnosis of Pregnancy y Evaluation of High-Risk Pregnancy. In *Llama y alpaca care.* Pp 250 – 256
- Földi J., M. Kulcsár, A. Pécsi, B. Huyghe, C. de Sa, J. Lohuis, P. Cox y G. Huszenicza. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. *Animal Reproduction Science* 96: 265-281.
- Fowler, M. E. 1998. *Medicine y Surgery of South American Camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco.* 2nd Ed. Iowa State University Press. AMES.

- García, W., D. Pezo, F. San Martín, J. Olzabal y F. Franco. 2005. Manual del Técnico Alpaquero. Edit. ITDG AL.
- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard y H. N. Erb. 1998. Incidence of endometritis y effects on reproductive performance of dairy cows [Abstract]. *Theriogenology* 49:251.
- Gilbert, R. O., S. T. Shin, C. L. Guard, H. N. Erb y M. Frajblat. 2005. Prevalence of endometritis y its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 64: 1879–1888.
- González M., M. Ríos, y S. Mattar. 2007. Prevalencia de bacterias asociadas a la infertilidad infecciosa en bovinos de Montería. *Rev MVZ Córdoba*; 12(2): 1028-1035.
- Huanca, T., N. Apaza y R. Sapaná. 2007. Defectos congénitos y hereditarios visibles en alpacas de dos zonas representativas de la Región Puno. *Asociación Peruana de Producción Animal, Cusco, Perú*.
- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton y W. H. Johnson. 2004. Endometrial cytology y ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 62, 9–23
- Kasimanickam, R., T. F. Duffield, R. A. Foster, C. J. Gartley, K. E. Leslie, J. S. Walton, y W. H. Johnson. 2005. A comparison of the cytobrush y uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J.* 46:255–259
- Katila, T. 1995. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen. *Biol. Reprod. Mono*; 1: 515-517.

- Kenney, R.M. 1978. Cyclic y phatologic changes of the mare endometrioum as detected by biopsy, whit a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 172, 241-262.
- LeBlanc, S. J., T. F. Duffield, K. E. Leslie, K. G. Bateman, G. P. Keefe y J. S. Walton. 2002. Defining y diagnosing postpartum clinical endometritis y its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 85:2223–36.
- Lichtenwalner, A., G. Woods y J. Weber. 1996. Ejaculatory pattern of llamas during copulation. *Theriogenology* 46: 285-291.
- Liebich, H. G. 2010. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel.* ed 5°, Ed Stuttgart: Schattauer.
- Lynch, M., S. Raphael, L. Mellor, P. Spare y M. Inwood. 1987. *Metodos de laboratorio.* Segunda edición. Edit. Interamericana. Mexico.
- Martínez, M. A. 2014. Efecto de la época del año sobre los índices reproductivos en vacas Brown Swiss del CIP Chuquibambilla desde 1997 al 2013. Tesis FMVZ.
- Mateus, L., L. Lopes da Costa, F. Bernardo y J. Robalo Silva. 2002. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution y postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim.* 37:31–5.
- Melcher Y., I. Prunner, M. Drillich. 2014. Degree of variation y reproducibility of different methods for the diagnosis of subclinical endometritis. *Theriogenology* 82:57–63.
- Mendez D. (2008). *Determinacion de la microflora bacteriana uterina en vacas donantes de embriones.* Bogota, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Mendoza, G., L. Echevarria, C. Llerena, A. Castro, M. Dominguez, S. Gómez, M. Ghezzi y C. Barbeito. 2013. Comparación morfológica entre el útero fetal y el útero

- adulto de la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*). *Salud tecnol. Vet.* 1:1-6.
- Moat A. y J. Foster. 1988. *Microbial Physiology* 2da edition. United State of America: Editorial Jhon Wiley and Sons; 1:1-50.
- Otero C., C. Silva, O. Wilde, A. Ruiz y M. Nader. 1998. Variaciones de *Lactobacillus* y *Enterococcus* aislados de vagina de vacas durante ciclo estral. En: 22 Congreso Argentino de Producción Animal. Universidad de Tucumán.
- Overbeck W., K. Jäger, H. A. Schoon y T. Witte. 2013. Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus and in vitro study. *Theriogenology* 79:1262–8.
- Palmer, C. 2006. Endometritis en vacas de leche. In: *Jornadas de Actualización en Biotecnologías de la Reproducción en Bovinos*, Córdoba, Argentina.
- Palmer C. 2008a. Metritis postparto en vacas lecheras. En: *Jornadas de actualización en biotecnologías de la reproducción bovina del IRAC*. Argentina: Universidad de Saskatchewan.
- Palmer, C. 2008b. Endometritis en vacas lecheras. En: *Jornadas de actualización en biotecnologías de la reproducción bovina del IRAC*. Argentina: Universidad de Saskatchewan.
- Parraguez V., G. Adams, M. Ratto y L. A. Raggi. 2010. *Practical atlas of ruminant and camelid reproductive ultrasonography*. Editorial office 2121 state Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA.
- Pascottini, O. B., P. Dini, M. Hostens, R. Ducatelle y G. Opsomer. 2015. A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows. *Theriogenology* 84: 1438–1446

- Pascottini, O. B. y G. Opsomer. 2016. Postpartum uterine diseases in dairy cows: a review with emphasis on subclinical endometritis. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 378 – 385.
- Peso, D., W. Garcia, F. Franco, W. Bravo, V. Alarcon y F. San Martin. 2014. Manual del Tecnico Alpaquero. 2da edición. GMC Digital.
- Rodríguez G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méx*; 44: 464-475.
- Salomon, F. V., H. Geyer y U. Gille. 2005. *Anatomie für die Tiermedizin*.ed 1º, Ed Stuttgart: Enke Verlag.
- Sanchez R. y E. Alzonso. 2000. Ultrasonografía en Reproducción Animal. *Tecnología Veterinaria*. Disponible en: www.producción-animal.com.ar.
- Sanchez, M., C. Gonzales, R. Castañedas, A. Pulido, H. Guaqueta, M. Aranda y M. Rueda. 2011. Evaluacion citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos (estudio preliminar). *Rev. MVZ Córdoba* 16(3):2711-2720.
- Sandoval R., L. Ruiz, A. Santiani, A. Delgado, K. Choez, J. Pizarro y I. Arevalo. 2015. Evaluación de la capacidad diagnóstica de dos pruebas de campo en la detección de infecciones uterinas en camélidos sudamericanos. *Spermova* 5(1): 144 - 148
- Sapana R., T. Huanca, O. Cardenas, R. Mamani, M. Gonzalez y N. Apaza. 2012. Empadre Controlado de Alpacas Huacaya del CIP Quimsachata de INIA – Puno – Perú. En: VI Congreso Mundial sobre Cámelidos. Arica: Universidad de Chile.
- Sato, A. y L. Montoya. 1990. Aparato reproductor de la alpaca (*Lama pacos*), Anatomía macroscópica. *Rev. Camélidos Sudamericanos*; 7, 5-14.
- SENAMHI. 2014. Registros meteorológicos de la estación Chuquibambilla. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. Puno – Perú.

- Sheldon, I.M., D.E. Noakes y H. Dobson, 2002. Effect of regressing corpus luteum of pregnancy on ovarian folliculogenesis after parturition in cattle. *Biology of Reproduction*, 66, 266-271.
- Sheldon M. y H. Dobson. 2004. Postpartum uterine health in cattle. *Rev Anim Reprod Sci*; 82:295-306.
- Sheldon I. M., G. S. Lewis, S. LeBlanc, R. O. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*.
- Sheldon M., E. Williams, A. Miller, D. Nash y S. Herath. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *Rev Vet J*; 176(1):115-121.
- Studer E. y D. A. Morrow. 1978. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum uterine culture y endometrial biopsy. *J Am Vet Med Assoc* 172:489-94.
- Sumar, J. 1991. Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. Fernández-Baca (Ed). FAO, Santiago, Chile, pp 111-148.
- Tibary A. y A. Anouassi. 1996. Ultrasonographic changes of the reproductive tract in the female camel (*Camelus dromedarius*) during the follicular cycle y pregnancy. *J Camel Pract Res*; 3:71-90.
- Tibary A. y A. Anouassi. 2001. Uterine infections in camelidae. *Vet Sci Tomorrow*. 1: 1-12
- Tibary A., C. Ragle y S. Thompson. 2001. Abdominal endoscopy in clinical camelid theriogenology. *Proceedings of Twin Camelid Production y Reproduction conferences*, Reproductive Health Centre, Charleston SC, October 13-15th 2001.

- Tibary A. y A. Anouassi. 1997. Theriogenology in Camelidae: Anatomy, Physiology, BSE, Pathology y artificial breeding. Actes Editions, Institut Agronomique et Veterinaire Hassan 11, Morocco.
- Tibary A. y M. A. Memon. 1999. Reproductive physiology in the female South American camelidae. 6, 217-233.
- Tibary A., A. Anouassi y M. Memon. 2001. Approach to Diagnosis of Infertility in Camelids: Retrospective Study in Alpaca, Lamas y Camels. Vol 8 No 2, p 167-179. Department of Veterinary Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, WA 99164-6610, U.S.A.
- Tibary, A., C. Fite, A. Anouassi y A. Sghiri. 2006. Infectious cause of reproductive loss in camelids. Theriogenology 66: 633-647.
- Vadillo S., S. Píris y E. Mateos. 2002. Manual de microbiología veterinaria. Madrid, España: Editorial McGraw Hill Interamericana.
- Vasquez, M., C. Maffrand, L. Losinno y J. Maldonado. 2000. Manual de citología endometrial en yeguas. Rev. Col. Cienc. Pec. Vol. 13.
- Welsch U. y J. Sobotta. 2005. Lehrbuch Histologie. ed 2º, Ed München: Urban & Fischer.
- Wernery U., B. N. Kumar. 1995. Reproductive disorders in dromedary camels due to infectious causes y its• treatment. Journal of Camel Practice y Research.
- Wernery U. y R. Wernery. 1992. Uterine infections in the dromedary camel - a review. Proceedings of the First International Camel Conference, 2-6 February, Dubai, UAE.
- Zirena, B. 1978. Descripción Macro-microscópica del Aparato Reproductor Femenino de la Alpaca (*Lama pacos*) Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. UNA-Puno.

ANEXO

Tabla 1. Porcentaje de neutrófilos hallados con las técnicas de citocepillo y lavado uterino

Cito cepillo	Lavado uterino
0.95	0.00
30.42	6.28
11.54	0.00
15.74	2.91
32.38	12.84
4.22	0.00
29.76	0.00
6.51	0.00
43.24	0.00
55.37	0.00
23.85	30.41
0.00	23.42
10.42	3.88
3.00	0.00
1.92	0.00
56.63	0.90
11.88	0.00
10.96	2.33
3.45	2.20
6.34	

Tabla 2. Análisis de varianza para evaluar las técnicas de evaluación de citología endometrial en alpacas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Técnica	1	1.42588179	1.42588179	31.95	<.0001
Parto	1	0.01610378	0.01610378	0.36	0.5499
tecnica*parto	1	0.26360511	0.26360511	5.91	0.0175
Error	74	3.30263111	0.04463015		
Total corregido	77	5.00822179			

Tabla 3. Prueba de medias de Tukey entre las técnicas de evaluación de citología endometrial en alpacas

Técnica	Neutrófilo< LSMEAN	H0:MediaLS1=MediaLS2
		Pr > t
Cito cepillo	0.40550000	<.0001
Lavaje uterino	0.13261111	

Tabla 4. Porcentaje de neutrófilos hallados con las dos técnicas de tinción

Alpaca	Diff Quik	Giemsa	Alpaca	Diff Quik	Giemsa
5S 17	0.95	1.60	11S 119	3.00	4.98
6S 035D	30.42	33.78	11S 383	1.92	2.35
7S 119	0.00	0.00	11S 247	0.00	0.00
8S 08X	11.54	14.30	11S 253	0.00	0.00
8s 182E	15.74	16.12	12S 110E	0.90	3.51
8S 161	32.38	37.21	12S 237	56.63	69.42
8S 210E	6.28	7.32	12S 312F	11.88	23.00
8S 243E	0.00	0.00	13S 140E	0.00	0.00
8S 249E	2.91	1.59	13S 203E	3.45	4.21
8S 259	4.22	5.05	13S 209	10.96	12.68
9s 208	29.76	28.74	14S 03X	43.24	45.44
9S 222	6.51	6.64	14S 04X	0.00	0.00
9S 238F	12.84	13.77	14S 24X	0.00	0.00
9S 284F	0.00	0.00	14S 69X	0.00	0.00
10S 52E	10.42	9.84	14S 74X	55.37	57.21
10S 85E	0.00	0.00	S/A-	2.33	5.26
10S 118E	30.41	20.80	S/A_	2.20	3.50
10S 202	23.42	30.58	S/A	6.34	8.22
10S 295F	23.85	24.96	11S 31	3.88	4.01
10S 296	0.00	0.00			

Tabla 5. Análisis de varianza para evaluar las técnicas de tinción en la evaluación de citología endometrial en alpacas

Fuente	DF	Suma Cuadrado	Cuadrado Medio	F-Valor	Pr > F
Tinciones	1	0.00841154	0.00841154	0.13	0.7217
Error	76	4.99981026	0.06578698		
TOTAL	77	5.00822179			

Tabla 6. Diámetro de cuernos uterinos (mm) en alpacas primíparas y múltiparas

Hembras Múltiparas		Hembras Primíparas	
Cuerno Derecho	Cuerno Izquierdo	Cuerno Derecho	Cuerno Izquierdo
20	24	17	21
22	21	22	20
21	24	16	25
21	24	18	13
15	15	12	13
20	19	12	14
19	22	14	15
13	20	15	18
21	22	12	13
12	15	12	13
18	21	19	22
17	15	17	16
21	18	15	20
10	14	16	19
10	11	12	16
12	14	14	12
14	16	18	22
12	14	12	20
20	13	15	26
		20	18

Tabla 7. Análisis de varianza para diámetro de cuernos uterinos en alpacas primíparas y multíparas

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
cuerno	1	57.55128205	57.55128205	3.83	0.0542
Parto	1	10.84645749	10.84645749	0.72	0.3984
cuerno*parto	1	5.81056005	5.81056005	0.39	0.5361
Error	74	1112.676316	15.036166		
TOTAL	77	1186.884615			

Tabla 8. Prueba de medias para diámetro de cuernos uterinos en alpacas primíparas y multíparas

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	74
Error de cuadrado medio	15.45519
Valor crítico del rango estudentizado	2.81788
Diferencia significativa mínima	1.7739

Tukey Agrupamiento	Media	N	cuerno
A	17.8974	39	CI
B	16.0513	39	CD

Tabla 9. ANVA Diámetro de cuernos uterinos derecho e izquierdo

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Cuernos	1	66.461538	66.461538	4.35	0.0404
Error	76	1161.487179	15.282726		
Total corregido	77	1227.948718			

Tabla 10. Diámetro de cuernos uterinos (mm) en alpacas preñadas y vacías

Alpaca	Cuernos		Diagnóstico	Alpaca	Cuernos		Diagnóstico
	Der.	Izq.			Der.	Izq.	
8S 08X	21	24	Preñada	5S 17	20	24	Vacía
8s 182E	15	15	Preñada	6S 035D	22	21	Vacía
8S 210E	19	22	Preñada	7S 119	21	24	Vacía
8S 243E	13	20	Preñada	8S 161	20	19	Vacía
9S 222	17	15	Preñada	8S 249E	21	22	Vacía
9S 238F	21	18	Preñada	8S 259	12	15	Vacía
9S 284F	10	14	Preñada	9s 208	18	21	Vacía
10S 52E	17	21	Preñada	10S 202	18	13	Vacía
10S 85E	22	20	Preñada	10S 296	12	14	Vacía
10S 118E	16	25	Preñada	11S 31	14	15	Vacía
10S 295F	12	13	Preñada	11S 119	15	18	Vacía
12S 237	15	20	Preñada	11S 253	19	22	Vacía
12S 312F	16	19	Preñada	12S 110E	17	16	Vacía
13S 203E	14	12	Preñada	13S 140E	12	16	Vacía
14S 03X	10	11	Preñada	13S 209	18	22	Vacía
14S 69X	12	14	Preñada	14S 24X	14	16	Vacía
14S 74X	20	13	Preñada	S/A-	12	20	Vacía
11S 383	12	13	Preñada	S/A_	15	26	Vacía
11S 247	12	13	Preñada	S/A	20	18	Vacía
14S 04X	12	14	Preñada				

**Tabla 11. Análisis de varianza para el diámetro de cuernos uterinos en alpacas
preñadas y vacías**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F- Valor	Pr > F
Estado	1	70.15398111	70.15398111	4.77	0.0322
Cuerno	1	66.46153846	66.46153846	4.52	0.0369
Estado*cuerno	1	2.45951417	2.45951417	0.17	0.6838
Error	74	1088.873684	14.714509		
Total corregido	77	1227.948718			

Tabla 12. Prueba de medias

estado	diámetro LSMEAN	H0:MediaLS1=MediaLS2
		Pr > t
Preñada	16.0500000	0.0322
Vacía	17.9473684	