

PRIMENA CITOLOŠKIH BRISEVA U DIJAGNOSTICI ENDOMETRITISA KOBILA

Miroslav Urošević¹, Dragica Stojanović², Aleksandar
Milovanović², Ivan Pušić², Nenad Stojanac³

¹Poljoprivredna škola sa domom učenika Futog, Futog

²Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad,

³Poljoprivredni Fakultet, Novi Sad

Kratak sadržaj

Dijagnostika oboljenja materice i kontrola plodnosti obuhvataju klinička, bakteriološka, citološka i patohistološka ispitivanja. Bakteriološka istraživanja bi trebalo pratiti i sa citološkim i patohistološkim ispitivanjima, zbog toga što je prisustvo zapaljenskog procesa najznačajnije za dijagnozu i prognozu. Iako za interpretaciju rezultata citološkog pregleda endometrijuma nema standardne metode, pregled citoloških briseva sa površine sluznice uterusa jednostavna i neinvazivna dopunska metoda u pregledu kobila, i preporučuje se i u rutinskoj veterinarskoj praksi u našoj zemlji, pre svega za dijagnostiku endometritisa.

Cljučne reči: kobila, materica, bris, citologija

CYTOLOGY SWABS USED FOR THE DIAGNOSIS OF ENDOMETRITIS IN THE MARE

Miroslav Urošević^{2*1}, Dragica Stojanović², Aleksandar
Milovanović², Ivan Pušić², Nenad Stojanac³

¹*Agricultural School with students' dormitory, Futog*

²Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad,

³Faculty of Agriculture, Novi Sad

Summary

Diagnostics of the uterus and fertility control include clinical, bacteriological, cytological and histopathological examinations. Bacteriological studies should be accompanied by cytological and pathological

* E mail: uros_vet@yahoo.de

tests, because the presence of inflammatory processes is the most important for diagnosis and prognosis. Although, there is no standard method for the interpretation of cytological examination results for endometrium, the examination of cytologic swabs from the surface of the uterine mucosal surface is a simple and noninvasive method used as a supplementary examination in mares. In our country this method is recommended in veterinary practice, primarily for the diagnosis of endometritis.

Key words: mare, uterus, smear, cytology

UVOD

Endometritis

Plodnost kobila je uslovljena genetskim i paragenetski faktorima. Heritabilitet, odnosno udeo plodnosti koji se nasleđuje je nizak i iznosi 5-10%, a kod kasačkih kobila i do 20%. Relativno malu plodnost kobila uslovljava čitav niz faktora, kao što su greške u pripustu, dug estrus, razna patomorfološka stanja: hipofunkcija jajnika, endometritisi, tihi estrus, ovarijalne ciste, kao i nepridržavanje zoohigijenskih normativa: starost, slaba i deficitarna ishrana težak rad, greške u držanju, nedovoljna higijena, endoparazitaze i dr.

Oboljenja materične sluzokože - endometritisi su čest uzrok povadanja i steriliteta. Više autora (Küst i Schätz, 1983; Petrujkić i sar., 1996) su saglasni da su hronični endometritisi, posle ovarijalnih cista i disfunkcija jajnika, najčešći uzroci neplodnosti, u 20-25% kobila. U SAD je endometritis jedan od tri najčešća medicinska problema u odraslih konja. Prema novijim istraživanjima (Aurich, 2009) zapaljenje materice kobila može se, u zavisnosti od etiologije i patogeneze, podeliti na:

- polno prenosiva oboljenja (obligatno patogeni uzročnici)
- hronični – infektivni endometritisi (uslovno patogeni uzročnici)
- perzistirajući endometritis nakon parenja, odnosno osemenjavanja (engl. *post breeding endometritis*).

Klinička slika endometritisa

Kliničke karakteristike ispoljavaju se u vidu: izrazito crvene zažarene i vlažne sluzokože; u prednjem delu vagine nađe se manja ili veća količina patološkog sekreta, zavisno od stepena i karaktera endometritisa. Cerviks je mlitav, sluzokoža je vlažna i upaljena i iz njega ponekad ističe mukopurulentan sekret. U velikom broju slučajeva radi se o hroničnom – perzistirajućem endometritisu koji se može dokazati citološkim pregledom razmaza iz cerviksa.

MATERIJAL I METODE

Dijagnostika endometritisa

Dijagnostika oboljenja materice i kontrola plodnosti obuhvataju klinička (ultrazvučna), bakteriološka, citološka i patohistološka ispitivanja. Bakteriološka istraživanja bi trebala prpratiti i sa citološkim i patohistološkim ispitivanjima, zbog toga što je prisustvo zapaljenskog procesa najznačajnije za dijagnozu i prognozu (Belz i Glatzel, 1995; Card, 2005). Pojedini kliničari smatraju da rezultati bakterioloških ispitivanja ne mogu pravilno da se tumače bez citoloških nalaza (Langoni i sar., 1997).

Negnojni, neeksudativni endometritis (*endometritis sicca*) je klinički neprimetan i često bakteriološki negativan, te ga je zbog toga teško dijagnostikovati. Ovaj oblik traje dugo, često je uzrok steriliteta i nađen je u 15% jalovih kobila. Bakteriološkim pregledom sekreta materice mogu se izolovati: *Chlamydia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Candida spp.* i dr.

Citološki pregled endometrijuma

Citološki pregled razmaza napravljenih od briseva materice uveden je u veterinarsku praksu još 1980. godine kao tehnika koja će zajedno sa bakteriološkim pregledom upotpuniti dijagnostiku endometritisa kod kobila na početku estrusa. Brook (1985), Wingfield Digby i Ricketts (1982) opisali su citološki pregled endometrijalnih razmaza kao brz, jednostavan i praktičan test za dokazivanje endometritisa.

Prva istraživanja pokazala su pozitivnu korelaciju između prisustva polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita (PMN) u citološkim uzorcima i izolacije bakterija, kada je za uzimanje uzoraka korišćen bris za uterus zaštićen u plastičnoj foliji. Postupak uzimanja briseva za citološke preglede je opisan u ogledu od strane Bourke i sar. (1997) upoređivanjem dve metode uzorkovanja: pomoću pamučnog brisa i četkice. Istakli su da je preduslov za dobijanje kvalitetnih citoloških rezultata sakupljanje dovoljnog broja dobro očuvanih ćelija sa što šire površine uterusa. Ogled je urađen na 13 kobila, a uzorci su uzeti pomoću pamučnih briseva, a zatim i četkicama, koje su bile zaštićene pri ulasku u polne organe. Nakon uvođenja u cerviks, u oba slučaja su prvo iz folije izvučene „radne“ površine, a zatim okretanjem štapića, na njih „prilepljenje“ ćelije sluzokože uterusa, što je trajalo oko 15 sekundi. Sledilo je vraćanje briseva, odnosno četkica, u zaštitni omotač i izvlačenje iz reproduktivnih organa. Pamučni bris, odnosno četkica, je nakon toga pažljivo prevučen preko mikroskopske pločice u cilju pravljenja citološkog razmaza, zatim osušen, fiksiran i

obojen *Wrights* bojom. Razmazi su posmatrani pod uvećanjem od 100x i 600x. Autori su zaključili da je upotreba četkica bolja od pamučnih briseva, zato što se sakupi veći broj ćelija sa endometrijuma i one morfološki nisu promenjene.

Tumačenje citološkog nalaza

Dascanio i sar. (1997) su u svom istraživanju detaljno opisali postupak i tumačenje citološkog pregleda uterusa. Oni navode da neki praktičari ne upotrebljavaju citološki pregled uterusa u rutinskom radu, jer imaju poteškoća sa primenom metode i interpretacijom dobijenih rezultata. Prema ovim autorima, prvi korak u evaluaciji citološkog razmaza je odrediti opštu zastupljenost ćelija u uzorku pod malim uvećanjem (10x). Zastupljenost ćelija može se podeliti u 4 kategorije: loša, osrednja, dobra i odlična. Kada je prisutan mali broj ćelija u uzorku, može doći do smanjenja broja prisutnih neutrofila, ako se gleda pri velikom uvećanju (400x). To može, onog ko pregleda, da dovede u zabludu da nije prisutan zapaljenski proces, iako zapravo on postoji. Stepen zapaljenja kvantitativno se izražava brojanjem prisutnih ćelija na određenom broju vidnih polja pri uvećanju mikroskopa od 400x. U svakom slučaju, ako je broj ćelija u uzorku mali, to može dovesti do pogrešnog tumačenja rezultata (Slika 1), jer, u takvom uzorku bi trebalo da bude manje od 1 do 2 neutrofila na pet vidnih polja pod uvećanjem od 400x. Drugi istraživači su imali kriterijum sa više od pet neutrofila na 10 vidnih polja pri velikom uvećanju mikroskopa, da bi se takav nalaz svrstao u zapaljenski proces. Infekcije endometrijuma sa *Pseudomonas aeruginosa* bi mogle biti izuzetak u odnosu na spomenute kriterijume, jer su moguće i površinske infekcije sa malim brojem neutrofila. Ako je broj ćelija u uzorku manji od 10, trebalo bi sagledati i odnos različitih tipova ćelija. U odnosu na uzorak za koji se smatra da je iz zapaljenskog procesa, odnos ćelija endometrijuma prema neutrofilima trebalo bi da je manji od 40:1. Prisustvo limfocita, makrofaga ili plazmocita obično ukazuje na hroničan proces, mada se makrofagi mogu ponekad naći na završetku akutnog procesa.

Jednom kada se odrede tipovi ćelija i njihov relativan broj, treba proceniti stepen njihovog oštećenja. Obično se endometrijalne ćelije i neutrofilni dele na one u dobrom stanju („sveže”) i druge u procesu degeneracije (Slika 2). Degenerativne promene mogu da obuhvataju celu ćeliju ili njenje delove a ispoljavaju se u vidu promena u stanju ćelijske membrane, hipersegmentacije jedra, stvaranja vakuola, kapljica ili inkluzija, pojačanog bojenja citoplazme i bubrenja ćelije. Na kontaminiranim uzorcima obično se vide bakterije postavljene ekstracelularno sa malim brojem neutrofila.

U Tabeli 1 su navedeni tipovi ćelija, koji se mogu naći pri citološkoj analizi, njihovo poreklo i značaj. Konačno tumačenje citološkog nalaza endometrijuma se zasniva na evaluaciji spomenutih kriterijuma, sa uzorcima koji nalaz svr-

stavaju u jednu od dve kategorije: fiziološki ili zapaljenski. U fiziološke uzorke spadaju oni sa zdravim ćelijama endometrijuma i veoma retkim neutrofilima. U kategoriji zapaljenja broj neutrofila je definisan po sledećim kriterijumima.

Tabela 1: Tipovi ćelija i debrisa koje se mogu videti na citološkom pregledu uterusa

Tip ćelija	Poreklo	Značaj
ćelije endometrijuma	žlezde sluzokože ili lumena endometrijuma	Fiziološki
neutrofil	endometrijum	ukazuje na akutnu fazu zapaljenja
eozinofili	endometrijum	ukazuje na pneumometru (insuflaciju vazduha)
makrofagi	endometrijum	ukazuje na hronično zapaljenje ili regresiju akutnog zapaljenja
limfociti/plazmociti	endometrijum	ukazuje na hronično zapaljenje
eritrociti	endometrijum	uzorci iz postpartalnog perioda ili usled traume kod uzimanja uzoraka
skvamozne/pločaste epitelne ćelije	cerviks	prisutne kao rezultat greška pri uzimanju uzoraka
skvamozne ćelije	vagina	prisutne kao rezultat greška pri uzimanju uzoraka
siderofagi (makrofagi sa nakupljenim hemosiderinom)	endometrijum	postpartalni period ili moguće kod pneumometre
kristali urina	urin	moguće unos urina, kao rezultat grešaka pri uzimanju uzoraka

Grupa ćelija u zapaljenskom procesu se obično deli još na akutnu i hroničnu, u zavisnosti od tipova ćelija koji su prisutni. Ako su prisutne degenerativne ćelije, u većini slučajeva je prisutan hronični proces ili je akutni proces pri kraju. Treba uzeti u obzir i negativan bakteriološki nalaz, u sledećim slučajevima: u prisustvu endometritisa; kada su u uterusu prisutne antimikrobne supstance; usled iritacije neinfektivne prirode; zbog pogrešne tehnike izolacije ili rasta specifičnih mikroorganizama (kao što su, na primer, anaerobne bakterije).

Sa druge strane, pozitivan bakteriološki nalaz može da prati negativan citološki rezultat, posebno tokom estrusa kada bakterije iz vagine mogu povremeno da se izoluju i iz uterusa. U pojedinim slučajevima oba nalaza mogu

biti negativna (i mikrobiološki i citološki), posebno na početku infekcije. Tada se preporučuje ponavljanje citološkog razmaza nakon nekoliko dana, kako bi se ispitao uspeh terapije (kao odgovor na tretman). Uz to, citološki pregled omogućuje veterinaru da uvede terapiju pre nego što dobije rezultate mikrobiološkog ispitivanja, što u većini slučajeva traje najmanje 3 dana. Od posebnog značaja je korišćenje citološkog pregleda kod kobila namenjenih za priplod. Za konačnu odluku da li je kobila spremna za priplod, trebalo bi uzeti u obzir negativan citološki pregled pre nego negativan mikrobiološki nalaz, pošto bakterije mogu biti prisutne i kod zdravih kobila. Kobile koje su pre toga (1-2 dana) bile pripuštene ili oždrebljene (7-10 dana) mogu povremeno imati povećan broj neutrofila.

Riddle i sar. (2005) su sproveli obimnu studiju u centralnom delu države Kentaki (Kentucky, SAD) kako bi ispitali odnos između procenta ždrebljenja i citološkog i bakteriološkog pregleda uterusa u uzgoju punokrvnih engleskih konja. Uopšte, u uzgoju punokrvnjaka u centralnom delu države Kentaki, propisi zahtevaju da sve juvenilne kobile i omice pre prve oplodnje (pripusta) imaju negativan bakteriološki nalaz brisa uterusa. U ovom istraživanju, citološki i bakteriološki uzorci brisevi sa uterusa uzeti su od 970 punokrvnih engleskih kobila tokom sezona pripusta u periodu od 2001. do 2004. Na svakoj pločici je pregledano najmanje po 10 vidnih polja. Nalazi su analizirani na sledeći način: normalan citološki nalaz; prisutne epitelne ćelije i nula do 1 neutrofil pri uveličanju 100x; blago izražena inflamacija, epitelne ćelije i 2 do 5 neutrofila pri uveličanju 100x; izražena inflamacija, epitelne ćelije i više od 5 neutrofila pri uveličanju 100x; i hipocelularni uzorak, bez epitelnih ćelija na pločici. Od 2123 pregledanih parnih uzoraka za citološki i bakterioloških pregled 1537 (72,4%) je bilo normalno (0 do 2 neutrofila ili bez izolovanih bakterija). Utvrđeno je da 79 uzoraka nema dovoljan broj ćelija za pregled i nisu uključeni u definitivnu analizu rezultata istraživanja. Blaga do izražena inflamacija konstatovana je na 423 citološka nalaza, pri čemu su iz 231 uzoraka brisa uterusa izolovane bakterije. U ovoj retrospektivnoj studiji za dijagnostiku su korišćeni rezultati kako citološkog, tako i bakteriološkog pregleda uterusa, zato što je procenat ždrebnosti smanjen u kobile koje su imale zapaljenje materice.

Autori su konstatovali da je skoro dvostruko više kobila (1,8 puta) sa patološkim poremećajima dijagnostikovano citološkim pregledom nego bakteriološkim metodama. Zaključili su da se citološkim pregledom uterusa mnogo brže identifikuju kobile sa endometritisom nego bakteriološkim pregledom zato što se uzorci obrađuju i analiziraju istog dana kada su i uzeti od strane zaposlenih u laboratoriji ili u veterinarskim ambulantomama.

Da je za dijagnozu endometritisa potrebno uraditi bakteriološka i citološka ispitivanja potvrđuju u novijim izveštajima i autori iz Kanade (Brito i Barth, 2003). Oni navode da dijagnoza endometritisa mora biti bazirana na prisustvu

zapaljenja. Objašnjavaju da se endometritis može javiti i u odsustvu infekcije uterusa i da izolacija bakterija iz uterusa ne mora da znači i prisustvo endometritisa. Međutim, ako se ne izoluju bakterije, ne isključuje se dijagnoza endometritisa. Treba uzeti u obzir i anamnestičke podatke odnosno istoriju bolesti i predisponirajuće faktore: starost i broj ždrebljenja. Autori ukazuju da citološki pregled predstavlja jednostavnu, brzu i neinvazivnu metodu za utvrđivanje zdravstvenog statusa endometrijuma. Brisevi se nanose na mikroskopske pločice, razmazi se osuše, a zatim fiksiraju metanolom i oboje hematološkim bojama (Giemsa). U razmazu briseva iz uterusa prisustvo neutrofila je znak zapaljenja, što je ujedno i definitivna potvrda endometritisa. Svakako, uz više praktičnog iskustva moguće je razlikovati fiziološki od patološkog razmaza iz uterusa i bez brojanja svih ćelija. Od pomoći može biti bojenje po Gram-u kako bi odredili kojoj grupi bakterija pripada (Gram + ili Gram -) i time izabrali antibiotsku terapiju pre dobijanja rezultata bakteriološkog pregleda. I drugi istraživači su ukazali na značaj citološkog pregleda briseva materice.

I u našoj zemlji su rađena ispitivanja cervikalnih briseva endometrijuma od strane Urošević i sar. (2010). Oni su u ogledu na 51 priplodnih kobila koristili specijalne dvostruko zaštićene biseve - „četkice“ za citološka ispitivanja („MINITUBE GmbH“, Tiefenbach, Nemačka). Uzimanje uzoraka sa sluznice materice urađeno je je tako što je zaštićen bris je pomoću sterilnog spekulumu ili digitalno uveden kroz cerviks u unutrašnjost (lumen) uterusa. Bris je otkriven u unutrašnjosti materice kako bi onemogućili kontaminaciju uzoraka. Kad je izvučen iz polnih organa kobile, napravljen je razmaz endometrijuma za citološki pregled (Slika 3).

Na kraju, važno je naglasiti da za interpretaciju rezultata citološkog pregleda endometrijuma nema standardne metode. Ipak, može se zaključiti da je pregled citoloških briseva sa površine sluznice uterusa jednostavna i neinvazivna dopunska metoda u pregledu kobila, i trebalo bi da se primenjuje i u rutinskoj veterinarskoj praksi u našoj zemlji, u cilju procene zapaljenskih procesa na endometrijumu.

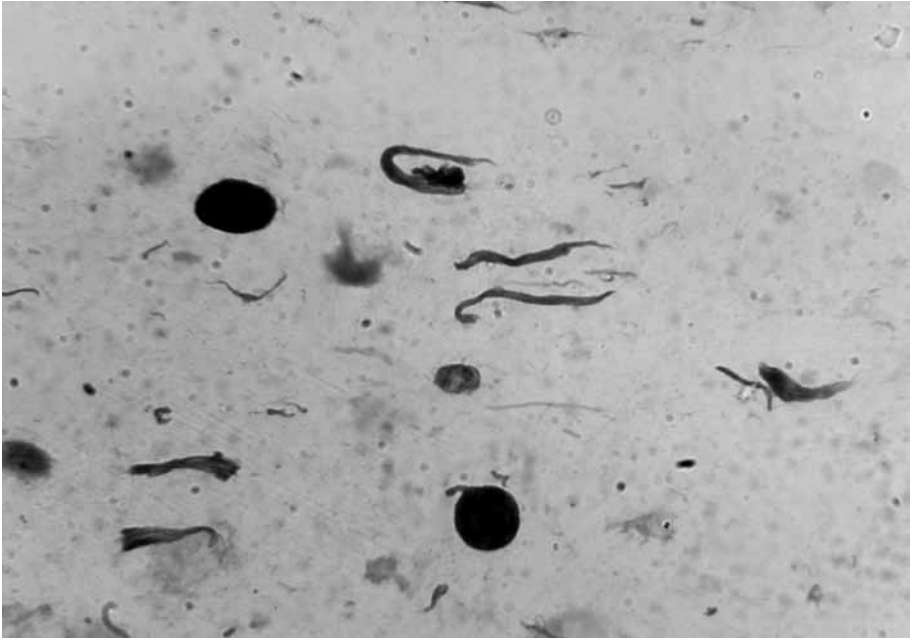
LITERATURA

1. Aurich Ch.: Reproduktionsmedizin beim Pferd. Gynäkologie – Andrologie – Geburtshilfe. Stuttgart: Parey Verlag, 2009.
2. Bourke M., Mills J.N., Barnes A.I.: Collection of endometrial cells in the mare. *Aust. Vet. J.*, 75, 10, 755 - 758, 1997.
3. Belz J.P., Glatzel P.S.: Fertility in mares after a disturbed as well as an undisturbed puerperium. Significance of histological and cytological examinations of the uterus. *Tierärztl. Prax.*, 23, 267 - 272, 1995.

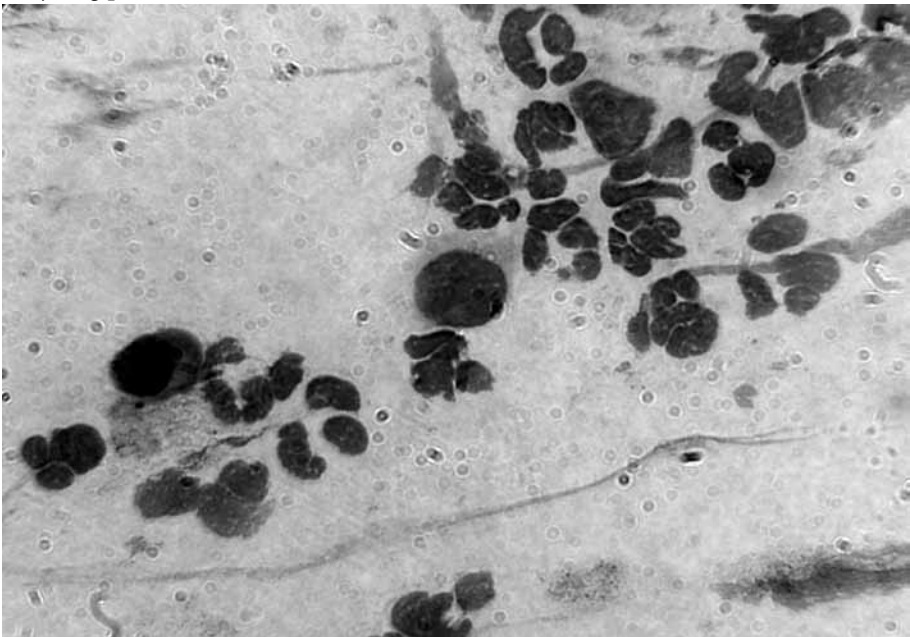
4. Brito L.F.C., Barth A.D.: Endometritis in Mares, *Large Animal Veterinary Rounds*, 9, 3, 2003.
5. Brook D.: Cytological and bacteriological examination of the mare's endometrium. *Equine Vet. Sci.*, 5, 16–22, 1985.
6. Card C.: Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares, *Theriogenology*, **64**, 580–588, 2005.
7. Dascanio J., Ley B., Bowen J. M.: How to Perform and Interpret Uterine Cytology, *AAEP Proceedings*, 43, 182 – 186, 1997.
8. Küst D., Schätz F.: Fortpflanzungstörungen bei den Haustieren, Jena 1971.
9. Knudsen O.: Partial dilatation of the uterus as a cause of sterility in the mare. *Cornell Vet.*, 54, 423 - 438, 1964.
10. Laing I. A.: Fertility and Infertility the Domestic Animals. Sec. edition, London, 1970.
11. Langoni H., Alvarenga M.A., Papa A.F.O., Sakamoto S., Baldini S., Listoni F.J.P.: Aerobic, microaerobic and anaerobic bacteria in equine endometritis. *Pferdeheilkunde*, 13, 548, 1997.
12. Petrujkić, T., Miljković, V., Mrvošić, G., Vuković, D., Veselinović, S., Trivicki, G., Bojkovski, J., Popović, N., Ivkov, V., Radojčić, S.: Stanje reprodukcije konja u Jugoslaviji i utvrđivanje priplodne sposobnosti. U: Program razvoja konjarstva Jugoslavije, SPITJ, Zobnatica, 1996.
13. Ulgen M., Seyrek-Intas K., Misirliogly D., Seyrek-Intas D., Kocabiyik A.L., Sevimli A.: Importance of reproductive management on fertility of Mares in Turkey. *Revue Med. Vet.*, 154, 5, 345 - 350, 2003.
14. Wingfield Digby N.J., Ricketts S.W.: Results of concurrent bacteriological and cytological examinations of the endometrium of mares in routine stud farm practice 1978–1981. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 32, 181 - 185, 1982.
15. Riddle W.T., Leblanc M.M., Pierce S.W., Stromberg A.T. (2005): Relationships between pregnancy rates, uterine cytology, and culture results in a thoroughbred practice in Central Kentucky. *Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 51-54.
16. Urosevic M., Lako B., Milanov D., Urosevic I., Aurich C.: Results of bacteriological and cytological examinations of the endometrium of subfertile mares in stud farms in Serbia. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 123, 9/10, 10-13, 2010

Primljeno: 15.11.2011.
Odobreno: 20.12.2011.

Prilozi:



Slika 1. Primer citološkog razmaza endometrijuma bez ćelija sa površine materice, obojenog po *Giems*-i



Slika 2. Primer polimorfonuklearnih neutrofilnih granulocita (PMN) na citološkom razmazu ćelija sa površine materice, obojenog po *Giems*-i



Slika 3. Pravljenje citološkog razmaza na pločici sa četkice iz uzetog cervikalnog brisa