

DOI 10.7251/VETJSR2401054M

UDK 636.2.09:618.14-006.6

Originalni naučni rad

KLINIČKI ENDOMETRITIS KRAVA: KORELACIJA TELESNE KONDICIJE, KVALITETA VAGINALNE SLUZI, LAKTACIJE, DNEVNE MLEČNOSTI I PROCENTA POLIMORFONUKLEARNIH ĆELIJA U CITOLOŠKOM RAZMAZU ENDOMETRIJUMA

**Bojan MILOVANOVIĆ^{1*}, Milan MALETIĆ², Nemanja ZDRAVKOVIĆ¹,
Nemanja JEZDIMIROVIĆ¹, Slobodanka VAKANJAC², Jovan BLAGOJEVIĆ²,
Branislav KURELJUŠIĆ¹**

¹Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, Srbija

*Korespondentni autor: Bojan Milovanović, bojan.milovanovic@nivs.rs

Sažetak

Ova studija je imala za cilj da utvrdi korelaciju između ocene telesne kondicije, proizvodnih parametara (laktacija i dnevna proizvodnja mleka), kvaliteta vaginalne sluzi i procenta polimorfonuklearnih ćelija iz citološkog razmaza poreklom iz materice mlečnih krava sa dijagnozom kliničkog endometritisa. Ispitivanje je obuhvatilo 14 Holštajn-Frizijskih krava u prvoj i drugoj laktaciji. Procena kvaliteta vaginalne sluzi je izvršena upotrebom Metrichcek[®] instrumenta. Citološki brisevi iz materice su uzorkovani upotrebom Cytoprint AI[®] katetera. Procena kvaliteta vaginalne sluzi i uzorkovanje citološkog brisa iz materice je izvršeno 25. i 26. dana laktacije. Rezultati ove studije su pokazali da ne postoji značajna korelacija između procenta polimorfonuklearnih ćelija i mlečnosti ili laktacije. Međutim, pronađena je značajna negativna korelacija između ocene telesne kondicije i kvaliteta vaginalne sluzi, što sugeriše da krave sa višim ocenama telesne kondicije imaju manji rizik za nastanak kliničkog endometritisa. Rezultati ove studije su u skladu s postojećom literaturom koja sugeriše da ocene telesne kondicije može poslužiti kao pokazatelj stepena rizika za nastanak kliničkog endometritisa.

Ključne reči: dnevna mlečnost, kvalitet vaginalne sluzi, laktacija, mlečna krava, ocena telesne kondicije, polimorfonuklearne ćelije.

UVOD

Smenjivanje gestaciono-nelaktacione faze u negestaciono-laktacionu fazu predstavlja visok faktor rizika za nastanak puerperalnih oboljenja i naziva se tranzicioni period (Contreras i Sordillo, 2011). Tokom ovog perioda dešavaju se fiziološke oscilacije, primarno u hormonalnim i metaboličkim putevima (Maletić i sar., 2024). Neposredno nakon teljenja, homeoretskim mehanizmima dolazi do preraspodele energije u mlečnu

Klinički endometritis krava: korelacija telesne kondicije, kvaliteta vaginalne sluzi, laktacije, dnevne mlečnosti i procenta polimorfonuklearnih ćelija u citološkom razmazu endometrijuma

žlezdu što dovodi do negativnog energetskog bilansa (NEB). Sistemska inflamacija kao i mineralni disbalansi takođe predstavljaju procese koji su uobičajena pojava u ovom periodu. Polovina tek oteljenih krava ne uspe da se adaptira na novonastale izazove što za posledicu ima nastanak strukturnih i molekulskih promena na nivou reproduktivnih organa primarno na nivou materice i jajnika (Serbetci i sar., 2023). Ove promene se mogu manifestovati u vidu kliničkih i supkliničkih oboljenja (Maletić i sar., 2024). U ova oboljenja se ubrajaju puerperalna oboljenja materice, metabolički disbalansi kao i lokomotorna oboljenja (Vergara i sar., 2014).

Prevalenca puerperalnih oboljenja materice poput puerperalnog metritisa, kliničkog metritisa, kliničkog endometritisa (KE) i supkliničkog endometritisa je 2.8%, 25%, 29% i 26% respektivno (Vallejo-Timaran i sar., 2021). Sve u svemu, prevalenca postporođajnih oboljenja materice tokom prvih 60 dana nakon teljenja je 51.2%. Međutim, prevalenca zavisi od tipa farme odnosno načina držanja, individualnih karakteristika krava, dana uzorkovanja i primenjenim graničnim vrednostima.

Klinički endometritis predstavlja oboljenje materice koje nastaje nakon 21 dana posle teljenja (DPT) i manifestuje se klinički vidljivim znakovima bolesti, te stoga ne predstavlja problem u rutinskoj dijagnostici (Sheldon i sar., 2009). Međutim, stepen oštećenja odnosno inflamacije tokom KE može da varira. Metode kojima se može utvrditi stepen oštećenja/inflamacije prouzrokovan sa KE se može kvantifikovati upotrebom Metricecka® (Pleticha i sar., 2009) i određivanjem stepena inflamacije endometrijuma upotrebom citoloških briseva (Milovanović i sar., 2023).

Cilj ovog rada je da se utvrdi da li postoji veza/korelacija između pojedinih telesnih faktora (ocena telesne kondicije (OTK)), proizvodnih parametara (laktacija i dnevna mlečnost), kvaliteta vaginalne sluzi i procenta polimorfonuklearnih ćelija (PMN) kod krava obolelih od kliničkog endometritisa.

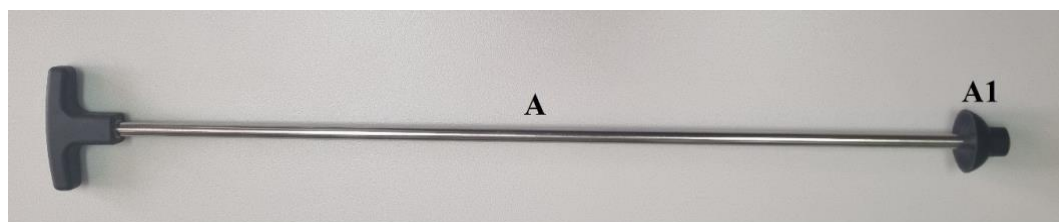
MATERIJALI I METODE

Ovaj eksperiment je obuhvatio ukupno $n=14$ krava Holštajn-Frizijske rase koje su bile u prvoj i drugoj laktaciji. Krave koje su obuhvaćene eksperimentom su bile prosečne telesne mase $550 \pm 32,4$ kg. Sve krave su hranjene identičnom ishranom u vidu kompletnog miksovanog obroka (TMR). Krave su vakcinisane vakcinama Bovilis BVD® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand), Bovilis IBR Marker live® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand) i Bravoxin 10® (MSD Animal Health, Wellington, New Zealand). Upotrebom farmskog softvera DairyComp 305 (Valley Agricultural Software, Tulare, California) dobijeni su podaci vezani za broj laktacija, dane u laktaciji i dnevnu mlečnost.

Klinički pregledi krava izvršeni su 25. i 26. dana nakon teljenja. Neposredno pre određivanja kvaliteta vaginalne sluzi i uzorkovanja brisa iz materice izvršen je vizuelni pregled krava. Za eksperiment su odabrane samo krave koje su imale patološki vaginalni iscedak.

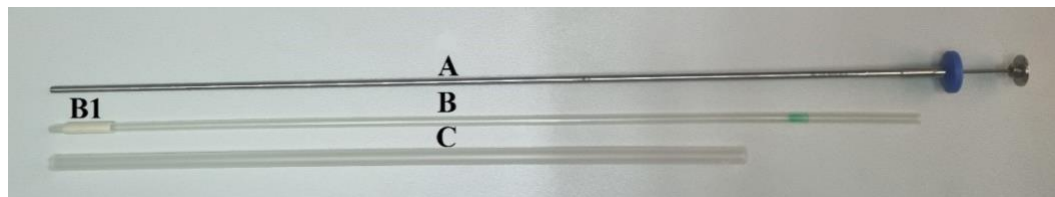
Ocena telesne kondicije (OTK) izvršena je po metodi opisanoj od strane (Bauer, 2021) koja se sastoji od gradacione skale OTK 2-5.

Provera kvaliteta vaginalne sluzi je izvršena uz pomoć Metricheck® instrumenta (Slika 1) (Simcro, New Zealand). Pre uvođenja instrumenta u vaginu, usmine su očišćene papirnim ubrusom kako bi se sprečila kontaminacija. Nakon toga, instrument je uveden u vaginu i sproveden do *fornix vaginae*. Ručka instrumenta lagano je podignuta ka dorzalnoj komisuri vagine i instrument retrahovan kaudalno kako bi se sa ventralnog zida vaginalnog kanala prikupila vaginalna sluz (Milovanović i sar., 2023). Određivanje kvaliteta vaginalne sluzi je izvršeno vizuelnom metodom opisanom od strane (Pleticha i sar., 2009), na sledeći način: ocena 0=čista prozirna sluz, ocena 1=sluz sa krpicama gnoja, ocena 2=mukopurulentni iscedak, ocena 3=gnojni/smrđljivi/truležni iscedak.



Slika 1 Metricheck® instrument za kvalitativnu analizu kvaliteta vaginalne sluzi (A-Metrichecka®; A1-kolektor vaginalne sluzi)

Uzorkovanje citološkog brisa iz materice je izvršeno upotrebom Cytoprint AI® katetera (Slika 2).



Slika 2 Inseminator i Cytoprint AI® kateter za uzorkovanje citološkog brisa endometrijuma

(A-inseminator za veštačko osemenjavanje; B-Cytoprint AI® kateter; B1-vrh Cytoprint AI® katetera za uzorkovanje citološkog brisa endometrijuma; C-protektivni tubus Cytoprint AI® katetera)

Pre uzorkovanja citološkog brisa, *ampula recti* je ispražnjena manuelno. Nakon toga, usmine su obrisane papirnim ubrusom. Cytoprint AI® kateter je stavljen na inseminator (pistolet). Bimanuelnom metodom, uz rektalno navođenje Cytoprint AI® kateter je uveden kroz *cervix* u matericu. Bris je eksponiran povlačenjem protektivnog tubusa ka rukohvatu inseminatora. Bris sa dorzalnog zida materice je uzorkovan rotiranjem

Klinički endometritis krava: korelacija telesne kondicije, kvaliteta vaginalne sluzi, laktacije, dnevne mlečnosti i procenta polimorfonuklearnih ćelija u citološkom razmazu endometriјuma

inseminatora sa Cytoprint AI® kateterom u smeru kretanja kazaljki na satu. Nakon toga, protektivni tubus Cytoprint AI® katetera je vraćen u početni položaj kranijalno kako bi se citološki bris zaštitio od kontaminacije prilikom retrahovanja napolje (Milovanović i sar., 2023). Nakon ekstrakcije instrumenta van vagine pristupljeno je pripremanju citološkog preparata. Čista mikroskopska pločica (Menzel Gläser, Braunschweig, Germany) je pripremljena i na nju je nanesen vrh Cytoprint AI® katetera na kome se nalaze ćelije poreklom sa endometriјuma. Silikonski vrh katetera je celom dužinom mikroskopske pločice rotiran kako bi se ćelije ravnomerno nanele na mikroskopsku pločicu. Mikroskopska pločica sa citološkim razmazom je nakon toga ostavljena da se osuši na sobnoj temperaturi i transportovana do laboratorije.

Priprema citološkog preparata je izvršena bojenjem citološkog razmaza upotrebom MGG Quick Stain (Bio Optica, Milano, Italy) prema uputstvu od strane proizvođača. Citološki preparati su nakon toga osušeni na vazduhu. Mikroskopska procena preparata je izvršena brojanjem minimum 200 ćelija na uvećanju 400×. Utvrđivanje procenta polimorfonuklearnih ćelija (PMN) je izvršeno upoređivanjem odnosa endometriјalnih i PMN ćelija (Slika 3).

Statistička obrada podataka je urađena u programskom sistemu Prism ver.8 (Graphpad, USA), a rezultati su prikazani kroz tabele i grafikone u programskom softveru MS Office Package (Microsoft, USA).

REZULTATI

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom istraživanju uočeno je da je dnevna mlečnost ispitivanih grla varirala od 13,00 L do 29,70 L mleka, u proseku 22,39 L. Kvalitet vaginalne sluzi bio je u opsegu između 1 i 3, u proseku 2,88. Ocena telesne kondicije kretala se u intervalu između 2,5 i 3,25, u proseku 2,85 dok je % PMN u citološkim brisevima materice bio u opsegu od 5,39-82,92%. Detaljni rezultati ovih parametara za svaku kravu pojedinačno su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1 Rezultati proizvodnje mleka, procenta polimorfonuklearnih ćelija, ocene telesne kondicije i kvaliteta vaginalne sluzi prikazani u pojedinačnim vrednostima za svaku ispitivanu jedinku

Krava	Laktacija / grupa	Dnevna proizvodnja mleka u litrima	% PMN u citološkom brisu	OTK	Kvalitet vaginalne sluzi
1.	1	29,7	29,16	2,75	2
2.	2	27,1	61,88	3,25	1
3.	1	27,6	82,92	2,75	3
4.	2	22	50,08	2,75	1
5.	2	19	5,39	3	1

6.	2	26	41,83	2,75	1
7.	2	19	35,23	2,75	2
8.	1	13	69,9	2,75	3
9.	2	21	66,81	3	2
10.	2	23	42,51	3	1
11.	1	25	50,61	2,5	3
12.	1	22	80	3	1
13.	1	16	65,06	3	1
14.	1	23	35,89	3	1

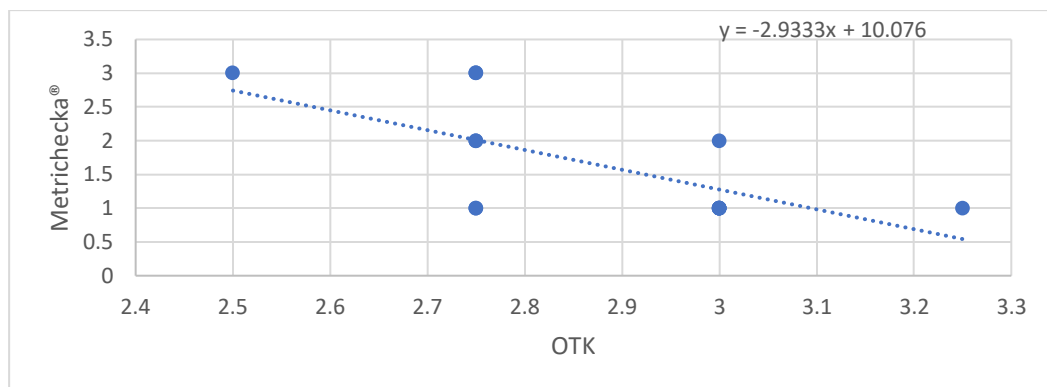
Rezultati statističke analize su prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2 Utvrđene korelacije između ispitivanih parametara

Parametri	Laktacija / grupa	Dnevna proizvodnja mleka u litrima	% PMN	OTK	Metrich eck®
Laktacija	1,00	-0,09	-0,37	0,25	-0,40
Dnevna proizvodnja mleka u litrima	-0,09	1,00	-0,08	-0,15	0,06
% PMN	-0,37	-0,08	1,00	0,06	0,31
OTK	0,25	-0,15	0,06	1,00	-0,66*
Metrich eck®	-0,40	0,06	0,31	-0,66*	1,00

* statistička značajnost utvrđena na nivou $p < 0.05$

Statistički značajna korelacija je uočena u odnosu OTK i Metrich eck® parametara, pri čemu je uočeno da krave sa visokim Metrich eck® skorom imaju nižu OTK vrednost. Odnos Metrich eck® i OTK rezultata je prikazana na Slici 3.



Slika 3 Korelativna analiza rezultata parametara Metrichack® i OTK

DISKUSIJA

Nakon teljenja, krave se adaptiraju na promene koje su nastale smenjivanjem gravidno-nelaktacione faze u negravidno-laktacionu fazu. U ovom periodu nastaje sistemska inflamacija koja za cilj ima pripremu reproduktivnih organa za novu oplodnju i graviditet. Klinički endometritis nastaje ukoliko se inflamacija materice prolongira nakon 21 dana posle teljenja uz prisustvo patološkog vaginalnog iscetka i povećanog %PMN (Pascottini i sar., 2022). Dijagnoza KE se sprovodi upotrebom Metrichack® uređaja ili manuelno (Pascottini i sar., 2020).

Na osnovu dobijenih rezultata posmatrane grupe krava uočava se da bi u teoriji svako povećanje OTK za vrednost boda 1 dovelo do smanjenja Metrichack® vrednosti za 2,933 puta, odnosno, da krave koje imaju lošiju ocenu telesne kondicije imaju veći faktor rizika za nastanak KE. U praksi to ne znači da krave treba da budu preuhranjene već u adekvatnoj telesnoj kondiciji shodno proizvodno-reproduktivnoj fazi laktacije. Rezultati dobijeni u ovoj studiji korespondiraju sa rezultatima dobijenim u studijama koje su za cilj imale utvrđivanje veze između ova dva posmatrana parametra (Bogado Pascottini i LeBlanc, 2020; Kadivar i sar., 2014; Wathes i sar., 2009).

Ocena telesne kondicije predstavlja metodu kojom se indirektno može proceniti energetski status krava (Rearte i sar., 2023). Utvrđeno je da kod krava sa visokim energetskim deficitom inflamacija materice prolongirana i perzistira nakon 2 nedelje nakon teljenja za razliku od krava sa umerenim energetskim deficitom (Wathes i sar., 2009). Energetski deficit ukazuje na maladaptaciju na postpartalni period sa posledničnim nastankom metaboličkih oboljenja koja se odlikuju nedostatkom glukoze (Sordillo i Raphael, 2013). Ispitivanjem biohemijskih parametara iz seruma krava utvrđeno je da su nivoi neesterifikovanih masnih kiselina (NEFA), β -hidroksibuterne kiseline (BHB) značajno viši kod krava sa KE za razliku od zdravih krava (Bogado Pascottini i LeBlanc, 2020). Visoki nivoi NEFA i BHB ukazuju na metaboličku maladaptaciju na postpartalni period. Posledično tome dolazi do disfunkcije

polimorfonuklearnih ćelija još dok se nalaze u krvnom koritu, odnosno čak i pre nego što uđu u matericu. Takođe, analizom kompletne krvne slike utvrđeno je da krave koje se nalaze u visokom enerгетском deficitu imaju manje leukocita od krava koje su bile u umerenom enerгетском deficitu (Wathes i sar., 2009). Sa druge strane studija (Bartolome i sar., 2014) koja je za cilj imala upoređivanje protokola za terapiју KE je zaključila da krave koje imaju višu OTK znatno bolje reaguју na terapiју za razliku od krava sa niskom OTK (Bartolome i sar., 2014). Stoga, korelacija između OTK i Metrichеck® skora (kvaliteta vaginalne sluzi) dobijena u našoj studiji ukazuje da ovi parametri mogu biti koristan alat za procenu rizika za nastanak KE.

Korelacija % PMN i laktacije u našoj studiji nije utvrđena. Pojedine studije сугеришу da postoji razlika između %PMN shodno broју laktacija, odnosno da prvotelke imaju znatno вишi % PMN od višetelki (Mehrзad i sar., 2002), odnosno веći broj cirkulišućih eozinofila i nezrelih leukocita (Mehrзad i sar., 2002). Od % PMN zavisi odgovor materice na inflamaciju. Međutim, ukoliko se krava nalazi u stanju enerгетског deficita % PMN ne mora biti reprezentativan pokazatelj zdravlja materice, jer je funkcionalna sposobnost PMN u tom slučaju narušena nedostatkom glukoze. Takođe, da bi se ustanovila veza između %PMN, proizvodnih parametara možda je potrebno u analizu uključiti krave sa više od dve laktacije kao i веće grupe životinja nego što je to slučaj u našoj studiji.

Korelacija % PMN i dnevne mlečnosti u našoj studiji nije utvrđena. U studiji koja je za cilj imala utvrđivanje veze između proizvodnih parametara i supkliničког endometritisa odnosno % PMN i dnevne mlečnosti je ustanovila pozitivnu korelaciju između ova dva parametra (Barrio i sar., 2015). Studija Barrio i sar. (2015) je sprovedena u Španiji na веćem broју krava. Takođe, Španija ima topliju klimu, a pojedine studije su dokazale da % PMN zavisi i od klimatskih prilika (Olde Riekerink i sar., 2007).

ZAKLJUČAK

Ustanovljena je negativna korelacija između OTK i Metrichеck® skora (kvaliteta vaginalne sluzi). Tačnije, svako povećanje OTK za vrednost boda 1 dovela je do smanjenja Metrichеck® vrednosti za 2,933 puta. Odnosno, krave s višom ocenom OTK imaju manji rizik za nastanak kliničког endometritisa. Međutim, to ne znači da krave treba da budu preuhranjene, već da budu u adekvatnoj kondiciji shodno proizvodno-reproduktivnoj fazi laktacije. Korelacija između ostalih posmatranih parametara % PMN i proizvodnih parametara (laktacija i dnevna mlečnost) nije utvrđena.

Zahvalnica

Rad je podrжан sredstvima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (Ugovor br. 451-03-66/2024-03/200030 i 451-03-66/2024-03/200143).

Izjava o sukobu interesa: Autori izjavljuju da ne postoji sukob interesa.

LITERATURA

- Barrio M., Vigo M., Quintela L. A., Becerra J. J., García-Herradón P. J., Bello D. M., Fernandez-Sanchez F. I., Prieto A., Cainzos J., Pena A. I. (2015): Influence of subclinical endometritis on the reproductive performance of dairy cows. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 13(4):1-6.
- Bartolome J. A., Khalloub P., de la Sota R. L., Drillich M., Melendez P. G. (2014): Strategies for the treatment of dairy cows at high risk for postpartum metritis and for the treatment of clinical endometritis in Argentina. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1):79-85.
- Bauer J.-C. (2021): The Effect of Mindfulness on Entrepreneurs of Early-Stage Start-Up Teams. *Nomos Verlagsgesellschaft*, 109-118.
- Bogado Pascottini O., LeBlanc S. J. (2020): Metabolic markers for purulent vaginal discharge and subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 155:43-48.
- Contreras G. A., Sordillo L. M. (2011): Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3):281-289.
- Kadivar A., Ahmadi M. R., Vatankhah M. (2014): Associations of prepartum body condition score with occurrence of clinical endometritis and resumption of postpartum ovarian activity in dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 46(1):121-126.
- Maletić M., Prodanović R., Kureljušić B., Džakula S., Milovanović B. (2024): Uloga metaboličkih stresora u nastanku supkliničkog endometritisa kod krava. 35. Savetovanje Veterinara Srbije, Zbornik radova, 159-172.
- Mehrزد J., Duchateau L., Pyörälä S., Burvenich C. (2002): Blood and milk neutrophil chemiluminescence and viability in primiparous and pluriparous dairy cows during late pregnancy, around parturition and early lactation. *Journal of Dairy Science*, 85(12):3268-3276.
- Milovanović B., Kureljušić B., Milićević V., Zdravković N., Kureljušić J., Marinković D., Maletić M. (2023): Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma tauri* in Holstein Friesian dairy cows with subclinical endometritis. *Acta Veterinaria*, 73(3):421-431.
- Olde Riekerink R. G. M., Barkema H. W., Stryhn H. (2007): The effect of season on somatic cell count and the incidence of clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 90(4):1704-1715.
- Pascottini O. B., Leroy J. L. M. R., Opsomer G. (2022): Maladaptation to the transition period and consequences on fertility of dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(S4):21-32.
- Pascottini O. B., Van Schyndel J., Spricigo J. F. W., Rousseau J., Weese J. S., LeBlanc S. J. (2020): Dynamics of uterine microbiota in postpartum dairy cows with clinical or subclinical endometritis. *Scientific Reports*, 10(1):1-11.
-

- Pleticha S., Drillich M., Heuwieser W. (2009): Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(11):5429-5435.
- Rearte R., Lorenti S. N., Dominguez G., de la Sota R. L., Lacau-Mengido I. M., Giuliodori M. J. (2023): Monitoring of Body Condition in Dairy Cows to Assess Disease Risk at the Individual and Herd Level. *Animals*, 13(19):1-11.
- Serbetci I., González-Grajales L. A., Herrera C., Ibanescu I., Tekin M., Melean M., Magata F., Malama E., Bollwein H., Scarlet D. (2023): Impact of negative energy balance and postpartum diseases during the transition period on oocyte quality and embryonic development in dairy cows. *Frontiers in Veterinary Science*, 10:1328700.
- Sheldon I. M., Cronin J., Goetze L., Donofrio G., Schuberth H. J. (2009): Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6):1025-1032.
- Sordillo L. M., Raphael W. (2013): Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 29(2):267-278.
- Vallejo-Timaran D. A., Reyes J., Gilbert R. O., Lefebvre R. C., Palacio-Baena L. G., Maldonado-Estrada J. G. (2021): Incidence, clinical patterns, and risk factors of postpartum uterine diseases in dairy cows from high-altitude tropical herds. *Journal of Dairy Science*, 104(8):9016-9026.
- Vergara C. F., Döpfer D., Cook N. B., Nordlund K. V., McArt J. A. A., Nydam D. V., Oetzel G. R. (2014): Risk factors for postpartum problems in dairy cows: Explanatory and predictive modeling. *Journal of Dairy Science*, 97(7):4127-4140.
- Wathes, D. C., Cheng Z., Chowdhury W., Fenwick M. A., Fitzpatrick R., Morris D.G., Patton J., Murphy J. J. (2009): Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics*, 39(1):1-13.
-