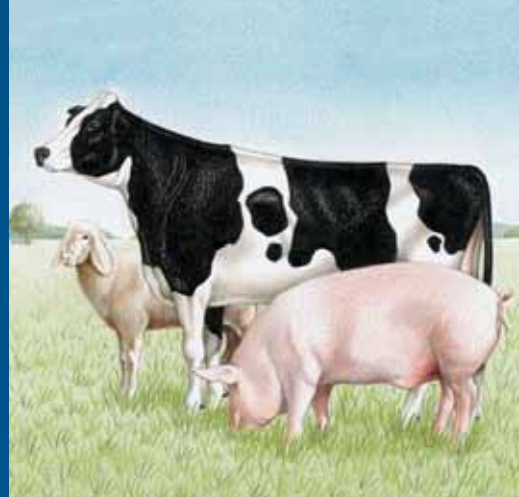


LAR



Large Animal Review

ISSN: 1124-4593

LARGE ANIMAL REVIEW è indicizzata su Science Citation Index (SciSearch®)
Journal Citation Reports/Science Edition e CAB ABSTRACTS

ARTICOLI ORIGINALI

BOVINI

- Sensibilità *in vitro* nei confronti dei principali antibiotici da parte degli agenti di mastite isolati nel Triveneto negli anni 2010-2014
- Analisi dei parametri riproduttivi e valutazione dei fattori di rischio per la febbre Q
- An innovative hyperimmune bovine plasma for prophylaxis and therapy of neonatal dairy calf diarrhea

SANITÀ PUBBLICA

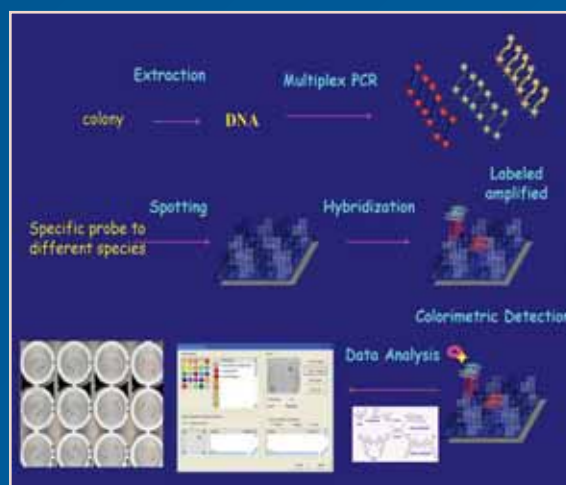
- A DNA chip-based method for rapid characterization of *Mycobacterium* isolates

SUINI

- A review on the use of vermiculite-based feed additives as possible control strategy for the reduction of environmental pollution

EQUINI

- Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy donkeys in Central Italy



ZOETIS



Anno 22, numero 3,
Giugno 2016

Rivista indicizzata su:
CAB ABSTRACTS e GLOBAL HEALTH
IF (aggiornato a Giugno 2013): 0.177

Direttore editoriale
Massimo Morgante

Comitato di redazione 2013-2015

Roberto Bardini - Cristina Casalone
Marco Colombo - Vincenzo Cuteri
Matteo Giancesella - Paolo Moroni
Paolo Pasquali - Mariano Pauselli
Giuseppe Piccione - Fabrizio Rueca

Segreteria di redazione
Matteo Giancesella

LARGE ANIMAL REVIEW è una rivista bimestrale pubblicata per favorire l'aggiornamento dei veterinari che si dedicano alla prevenzione e alla cura delle malattie degli animali da reddito e alla qualità e salubrità dei prodotti derivati.

Consiglio direttivo SIVAR 2014-2016

Daniele Gallo (Presidente)
Mauro Casalone (Presidente Senior)
Giacomo Tolasi (Vice Presidente)
Luigino Tondello (Segretario)
Mario Facchi (Tesoriere)
Osvaldo Parolin (Consigliere)
Gabriele Geninatti (Consigliere)
Roberto Bardini (Consigliere)
Vito Loconte (Consigliere)

Edizioni SCIVAC

Palazzo Trecchi - 26100 Cremona
Tel. 0372/460440
Iscrizione registro stampa del
Tribunale di Cremona n. 299 del 25/9/1995

Direttore Responsabile
Antonio Manfredi

Stampa

Press Point - Via Cagnola, 35
20081 Abbiategrosso (MI) - Tel. 02/9462323

Spedizione

Poste Italiane SPA - Spedizione in A.P.
D.L. 353/2003 (Conv. in L. 27/02/2004 N. 46)
Art. 1, Comma 1, DCB Piacenza

Concessionaria esclusiva per la pubblicità

E.V. Soc. Cons. a r.l.
Palazzo Trecchi - 26100 Cremona
Ufficio Pubblicità:
Francesca Manfredi - Tel. 0372/403538
E-mail: marketing@evsl.it
Paola Orioli - Tel. 0372/403539
E-mail: info@sivarnet.it

Prezzo di copertina: € 10,00.

La rivista è inviata a tutti i veterinari interessati ai settori degli animali da reddito con il versamento di € 52,00 per l'Italia; € 62,00 per l'Estero.

Servizio abbonamenti: Tel. 0372/403507.

Ai Soci SIVAR in regola con il pagamento della quota associativa, la rivista è inviata gratuitamente in quanto la quota è comprensiva dell'abbonamento alla rivista stessa.

SOMMARIO

ARTICOLI ORIGINALI



BOVINI

Sensibilità *in vitro* nei confronti dei principali antibiotici da parte degli agenti di mastite isolati nel Triveneto negli anni 2010-2014

C. CRESTANI, M. MANCIN, S. BONAMICO, C. SEGALIN,
A. BUSA, G. ROSA, B. DALL'AVA, E. NANNONI,
F. OSTANELLO, A. BARBERIO

99

Analisi dei parametri riproduttivi e valutazione dei fattori di rischio per la febbre Q in aziende di bovine da latte

S. MIOTTO, G. MINOZZI, G. VALLA, R. PICCININI

109

An innovative hyperimmune bovine plasma for prophylaxis and therapy of neonatal dairy calf diarrhea - a clinical trial

C. BRESCIANI, A. SABBIONI, R. CIAMPOLI,
M. BERTOCCHI, R. SALERI, C.S. CABASSI, E. BIGLIARDI,
F. DI IANNI, E. PARMIGIANI

115



SANITÀ PUBBLICA

A DNA chip-based method for rapid characterization of *Mycobacterium* isolates

M. BIAGETTI, P. MAZZONE, M. CIULLO, C. SEBASTIANI,
M.L. PACCIARINI, C. LAUTERIO, A. DE MONTIS

121



SUINI

A review on the use of vermiculite-based feed additives as possible control strategy for the reduction of environmental pollution from swine farming

R. CONSIGLIERE, D. MELONI

129



EQUINI

Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy donkeys in Central Italy

F. LAUS, V. FAILLACE, A.R. ATTILI, A. SPATERNA,
B. TESEI, V. CUTERI

137

RUBRICHE



VET-JOURNAL

A CURA DI M.G. MONZEGLIO

143



Combattere lo stress da caldo e sostenere la produzione di latte durante l'estate? Oggi si può!



Alltech® **GESTIONE STRESS DA CALDO**

Alltech può aiutare a sostenere la produzione e i titoli del latte durante l'estate, supportando la funzionalità ruminale e l'ingestione di sostanza secca.

Grazie all'utilizzo di tecnologie Alltech e a un livello adeguato e differenziato di minerali, siamo in grado di migliorare le performance e il benessere animale, sempre con un occhio di riguardo ai costi alimentari.

Alltech propone soluzioni naturali agli allevatori di tutto il mondo da oltre 30 anni, attraverso innovazioni come la gamma RUMENATE.

Per maggiori informazioni contatta:

Alltech Italy Srl

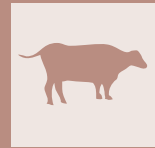
Via Parini 1 - Casalecchio di Reno - BO

Tel: 051434987 | Fax: 0514390324



Alltech.com/italy  [AlltechItalyNaturally](https://www.facebook.com/AlltechItalyNaturally)  [@Alltech](https://twitter.com/Alltech)

Sensibilità *in vitro* nei confronti dei principali antibiotici da parte degli agenti di mastite isolati nel Triveneto negli anni 2010-2014



C. CRESTANI¹, M. MANCIN², S. BONAMICO¹, C. SEGALIN¹, A. BUSA¹, G. ROSA¹, B. DALL'AVA¹, E. NANNONI³, F. OSTANELLO³, A. BARBERIO¹

¹ Istituto Zooprofilattico delle Venezie, Sezione territoriale di Vicenza

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Struttura complessa analisi del rischio e sorveglianza in sanità pubblica, Legnaro (PD)

³ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

RIASSUNTO

Vengono riportati i risultati dei test di sensibilità *in vitro* agli antimicrobici (metodo Kirby-Bauer) effettuati su ceppi batterici isolati da casi di mastite nel Triveneto, negli anni 2010-2014. I dati si riferiscono ai seguenti microrganismi: *S. aureus* e stafilococchi coagulasi-positivi (4694; 29,2%), *Streptococcus uberis* e *Enterococcus* spp. (4549; 28,3%), stafilococchi coagulasi-negativi (3099; 19,3%), *E. coli* (1467; 9,1%), *Streptococcus dysgalactiae* (1218; 7,6%), *Streptococcus agalactiae* (899; 5,6%). Sono stati presi in considerazione anche 1175 ceppi di *E. coli* isolati da vitelli con patologia enterica. Per il gruppo degli stafilococchi coagulasi-positivi, i valori più bassi di sensibilità si sono osservati nei confronti dei betalattamici (84,6%), delle tetracicline (88,7%) e dei macrolidi (89,7%). Nel 2014, la sensibilità di questo gruppo verso l'oxacillina (97,5%) è risultata significativamente superiore ($p < 0,05$) rispetto a quella media osservata nel quadriennio precedente (95,5%). Negli streptococchi, le percentuali maggiori di sensibilità si osservano verso betalattamici (75%-93,7%) e rifamicine (82,4%-92,1%). Per *E. coli*, si osservano percentuali di sensibilità superiori nei ceppi di derivazione mammaria (valori di sensibilità inferiori: 64,7% betalattamici; 70,5% tetracicline) rispetto a quelli isolati da sindrome enterica del vitello (valori di sensibilità inferiori: 27,3% tetracicline; 50,1% chinoloni). Per gli *E. coli* di origine mammaria, nel 2014 è stato osservato un aumento significativo ($p < 0,05$) della percentuale di sensibilità verso le cefalosporine di I e II generazione (da 20,4% del quadriennio 2010-13 a 34,1%).

PAROLE CHIAVE

Mastiti, antibiotico-resistenza, bovini, epidemiosorveglianza.

INTRODUZIONE

La mastite è una patologia condizionata della ghiandola mammaria ad eziologia batterica ampiamente diffusa nell'allevamento bovino da latte. Gli agenti eziologici di mastite sono estremamente diversificati sotto il profilo microbiologico, patogenetico, clinico ed epidemiologico e l'incidenza della patologia è spesso correlata a fattori ambientali e gestionali. Le mastiti sono responsabili di gravi perdite economiche riconducibili sia a costi diretti (latte scartato, terapie, spese veterinarie) sia a costi indiretti (calo delle produzioni, riforma anticipata e, sporadicamente, morte degli animali). La terapia di queste infezioni rappresenta una delle più importanti voci di spesa sanitaria dell'allevamento bovino da latte e quindi la scelta del farmaco da utilizzare deve essere fatta tenendo in considerazione sia criteri di efficacia sia le problematiche sanitarie legate allo sviluppo di fenomeni di antibiotico-resistenza, con possibile disseminazione di microrganismi resistenti nell'ambiente, nel latte e nei suoi derivati. Per i microrganismi responsabili di mastite, non esistono attualmente chiare evidenze scientifiche che supportino l'ipotesi di un incremento della diffusione della resistenza agli antibiotici¹. Tuttavia, i risultati degli studi variano a seconda dei di-

versi Paesi (europei ed extraeuropei) e sono spesso tra di loro in contrasto. Infatti, se da un lato alcuni autori² affermano che la proporzione tra isolati batterici sensibili e resistenti non sia variata negli anni e che la maggior parte dei patogeni mastidogeni siano generalmente sensibili agli antimicrobici più frequentemente utilizzati nella pratica clinica, altri³ sostengono il contrario, indicando un chiaro aumento della loro resistenza, evidente soprattutto per *S. aureus* verso penicillina e ampicillina ed *E. coli* verso tetracicline, betalattamici e lincomicina. Inoltre, è stato evidenziato come l'aumento dell'esposizione alla pirlimicina abbia un effetto diretto sull'aumento dello sviluppo di tratti di resistenza tra i microrganismi appartenenti al genere *Streptococcus*⁴. Interessante è anche quanto riportato da Tikofsky e coll.⁵ che hanno osservato una generale maggiore sensibilità agli antibiotici per i patogeni isolati da casi di mastite in bovine di allevamenti biologici, rispetto a quelli isolati da animali mantenuti in allevamenti di tipo intensivo.

La problematica della resistenza microbica ai chemioterapici rappresenta attualmente uno dei temi più rilevanti in campo sanitario, non tanto per le resistenze di tipo intrinseco, che naturalmente si osservano in batteri classificati all'interno di uno stesso gruppo tassonomico, quanto per le resistenze di tipo acquisito, risultato diretto della pressione selettiva esercitata dalle molecole antibiotiche sulla popolazione batterica. La sorveglianza dei fenomeni di antibiotico-resistenza riveste quindi un importante significato: promuovendo un

Autore per la corrispondenza:

Fabio Ostanello (fabio.ostanello@unibo.it).

impiego più consapevole e razionale degli antibiotici, essa contribuisce ad aumentare le probabilità di successo terapeutico e riduce i rischi per il consumatore⁶. A questo fine l'Unione Europea ha definito con la Decisione Comunitaria 652/2013 le modalità di attuazione di un piano di monitoraggio della resistenza antimicrobica dei batteri zoonotici e commensali, applicato in tutti i Paesi Membri a partire dal 1/01/2014. Va tuttavia sottolineato che solo la raccolta di dati di lungo periodo sul fenomeno (almeno 3-7 anni) consente di dimostrare la relazione tra utilizzo degli antimicrobici e loro effetto sull'andamento della resistenza.

Il presente lavoro è stato condotto con lo scopo di valutare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza di ceppi batterici isolati da casi di mastite bovina nelle Regioni Veneto, Friuli Venezia-Giulia e Trentino Alto-Adige, negli anni 2010-2014. Sono stati inoltre presi in considerazione ceppi di *E. coli* isolati da casi di diarrea del vitello al fine di confrontare le percentuali di sensibilità con i ceppi isolati da casi di mastite.

L'interpretazione dei dati relativi all'antibiotico-resistenza dei batteri responsabili di mastite è resa particolarmente complessa da due gruppi di fattori: 1) i microrganismi responsabili sono numerosi e con caratteristiche spesso profondamente diverse; 2) il panel di antibiotici utilizzato per l'antibiogramma è spesso consistente. Se, come nel presente lavoro, l'obiettivo è quello di quantificare e valutare il fenomeno dell'antibiotico-resistenza e, soprattutto, comunicare i risultati ai professionisti che dovranno decidere la terapia, un approccio basato sul binomio specie batterica-farmaco potrebbe fornire risultati di difficile comprensione e utilizzo. Per tali ragioni, l'analisi dei dati è stata condotta secondo un approccio che privilegiasse aggregazioni costruite secondo criteri microbiologici o farmacologici e non ha preso in considerazione le multi-resistenze. Solo per alcuni microrganismi, quali gli stafilococchi coagulasi-positivi (SCP) e *E. coli*, scelti in base alla loro importanza epidemiologico-clinica o per i potenziali rischi di sanità pubblica, la valutazione dell'antibiotico-resistenza è stata approfondita prendendo in considerazione le singole molecole ed è stata valutata anche l'eventuale variazione nel tempo della sensibilità nei confronti di alcuni farmaci di elezione (oxacillina, nel caso di SCP e cefalosporine per *E. coli*).

MATERIALI E METODI

Consistenza di aziende da latte e capi allevati

Nelle Regioni Veneto, Friuli Venezia-Giulia e Trentino Alto-Adige sono presenti più di 11000 aziende da latte con circa 302000 capi oltre i 24 mesi di vita (Anagrafe nazionale bovina, 2014). Le dimensioni medie aziendali sono fortemente condizionate dalle caratteristiche del territorio, variando da un minimo di 19 capi nella provincia di Bolzano, nell'ambito della quale è presente il maggior numero di allevamenti (5492), fino ad un massimo di 150 capi in quella di Rovigo, che rappresenta una delle provincie a minore densità.

Campioni esaminati

I dati fanno riferimento a 15926 isolati batterici ottenuti da campioni di latte provenienti da casi di mastite bovina ed esaminati negli anni 2010-14. I campioni sono stati prelevati principalmente da singolo quarto o, in caso di sospetta

mastite da patogeni contagiosi, da pool di latte dei 4 quarti. Per valutare eventuali differenze nei profili di antibiotico-resistenza tra ceppi di *E. coli* responsabili di mastite e ceppi di *E. coli* responsabili di sindromi diarroiche nei vitelli, sono stati inoltre esaminati 1175 campioni fecali, provenienti per la maggior parte da aziende da latte e, in percentuale ridotta, da linee vacca-vitello. I campioni di latte e di feci sono stati inviati ai laboratori delle sezioni diagnostiche dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) per l'esecuzione routinaria dell'isolamento degli agenti batterici e dell'antibiogramma.

Analisi batteriologiche

I campioni di latte di singolo quarto sono stati sottoposti all'analisi batteriologica secondo la procedura descritta dal National Mastitis Council. I campioni di pool dei 4 quarti venivano sottoposti ad analisi per la ricerca dei soli *Streptococcus agalactiae* e SCP. Per l'isolamento di *Streptococcus agalactiae* è stato impiegato il terreno selettivo tallio acetato, cristalvioletto e tossina stafilococcica (TKT, Centro servizi alla produzione IZSVe, Legnaro) secondo la metodica descritta da Bolzoni e coll.⁷, e la conferma delle colonie sospette veniva effettuata con il test di CAMP⁸. Per l'identificazione di SCP, il campione di latte è stato inoculato su terreno Baird Parker RPF (Biolife, Milano, IT) secondo la metodica precedentemente descritta⁹. I campioni di feci sono stati analizzati mediante l'utilizzo di terreni selettivi per *Enterobacteriaceae* e, sulle le colonie sospette, è stata eseguita l'identificazione di specie mediante impiego di test biochimici in micrometodo (API 20 E, Biomeriux, Marcy l'Etoile, FR).

Antibiogramma

La sensibilità nei confronti degli antibiotici di tutti i ceppi batterici isolati è stata valutata con il metodo di diffusione in agar da dischetto pre-imbevuto di antibiotico secondo le modalità descritte dal Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI VET01-A4)¹⁰. Gli antibiotici utilizzati e le relative categorie sono riportati in nelle Figure 1 e 2. I valori di breakpoints utilizzati per verificare la sensibilità ai diversi antibiotici da parte dei microrganismi erano quelli indicati dal CLSI¹⁰, ad eccezione del cefquinome, per il quale sono stati impiegati i valori forniti dal produttore (MSD, Kenilworth, N.J., USA), e la rifampicina, per la quale sono stati utilizzati, in assenza di standard relativi ai ceppi di origine animale, i valori indicati dalla linea guida CLSI M100 S24¹¹, facenti riferimento a ceppi di origine umana. Sulla base dei valori in millimetri indicati dai diversi breakpoints, i batteri testati sono stati classificati come sensibili (S), intermedi (I) o resistenti (R) ai singoli chemioterapici impiegati nel test. L'isolamento batterico e l'esecuzione dell'antibiogramma sono stati realizzati nei laboratori delle diverse sezioni diagnostiche applicando le medesime procedure standardizzate e uniformate con le metodologie previste dal sistema qualità dell'IZSVe.

Analisi statistica

Gli isolati batterici sono stati aggregati in 5 gruppi in base alle loro caratteristiche microbiologiche: 1) Stafilococchi coagulasi-positivi - SCP; 2) Stafilococchi coagulasi-negativi - SCN; 3) *Streptococcus agalactiae*; 4) *Streptococcus dysgalactiae*; 5) *Streptococcus uberis* + *Enterococcus* spp. I ceppi di *E. coli* sono stati distinti in base alla loro provenienza (mammaria o

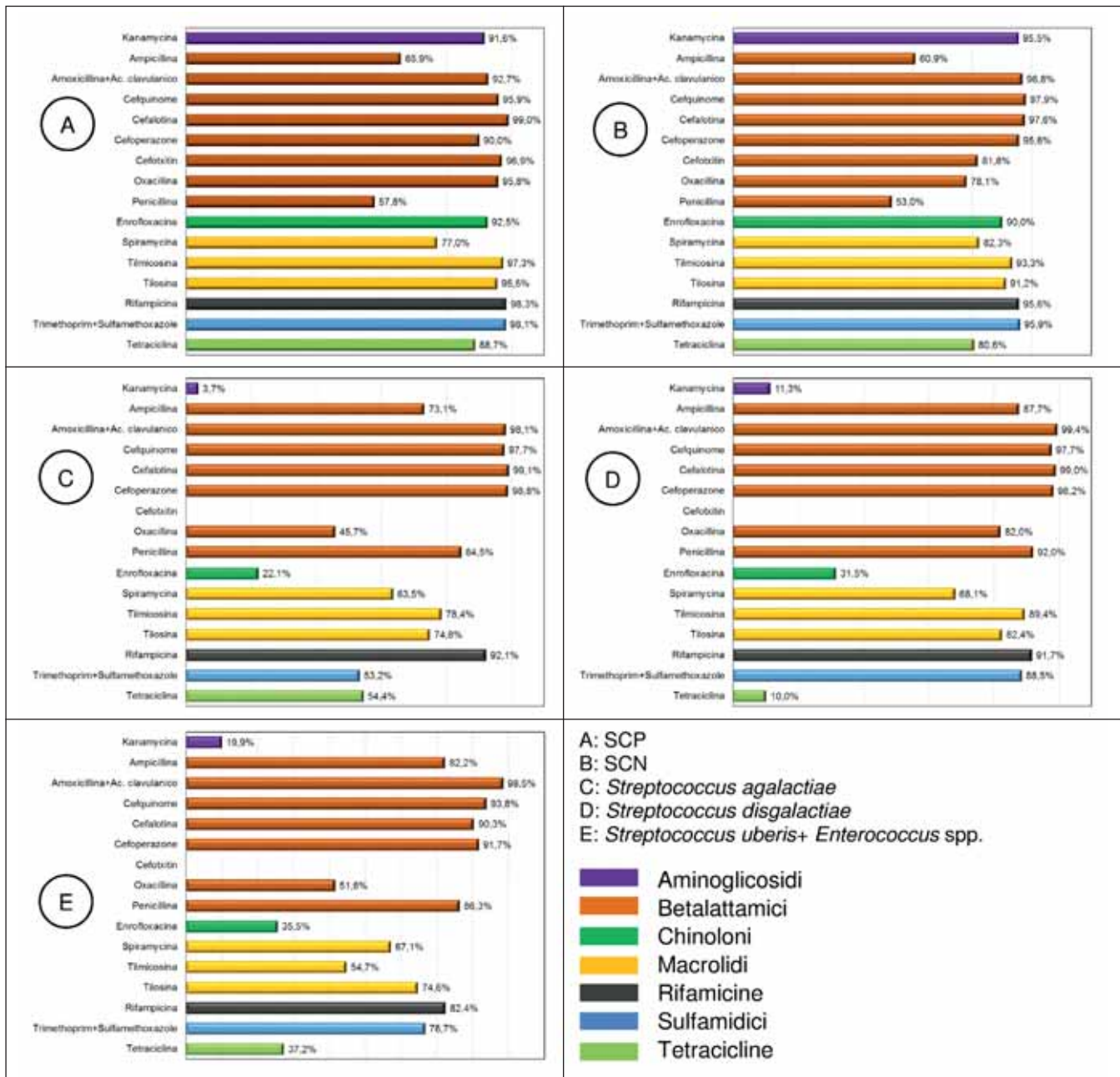


Figura 1 - Percentuali medie di sensibilità nei confronti delle diverse molecole.

intestinale). Le diverse molecole antibatteriche sono state aggregate secondo la categoria di appartenenza (Fig. 1 e 2). Per ciascuna di queste aggregazioni è stata calcolata la percentuale di ceppi risultati, rispettivamente, S, I, R sul totale dei ceppi esaminati. Tutte le successive analisi sono state eseguite sulla percentuale di ceppi risultati sensibili. Nel calcolo delle percentuali medie di sensibilità agli antibiotici sono stati esclusi dall'analisi tutti i risultati riferiti ad un numero di ceppi <30/anno, per evitare che distorsioni causate da un basso numero di ceppi con caratteristiche particolari nei confronti di specifiche molecole potessero influenzare sensibilmente questo valore¹². Analogamente, per evitare eventuali distorsioni legate alla diversa distribuzione di frequenza tra i gruppi considerati, i valori di sensibilità sono stati espressi come media ponderata. Il confronto dei gruppi batterici, in base alla distribuzione delle percentuali di antibiotico-resistenza alle diverse molecole testate, è stato realizzato utilizzando il test di Kruskal-Wallis. Per valutare una eventuale

differenza statisticamente significativa della sensibilità nell'ultimo anno di osservazione rispetto al dato medio dei quattro anni precedenti, è stato calcolato il test chi-quadro secondo il metodo proposto da Perla e Carifio¹³.

Sono state inoltre calcolate le percentuali medie di sensibilità e il relativo intervallo di confidenza esatto binomiale al 95% dei diversi gruppi batterici testati. Per le analisi statistiche, è stato utilizzato il software SPSS ver. 23 (IBM, SPSS Inc., Chicago IL, USA).

RISULTATI

La distribuzione assoluta e percentuale dei 15926 isolati batterici da casi di mastite è stata la seguente: SCP (4694; 29,5%), *S. uberis* e *Enterococcus* spp. (4549; 28,6%), SCN (3099; 19,5%), *E. coli* (1467; 9,2%), *S. dysgalactiae* (1218; 7,6%), *S. agalactiae* (899; 5,6%). Complessivamente, oltre il

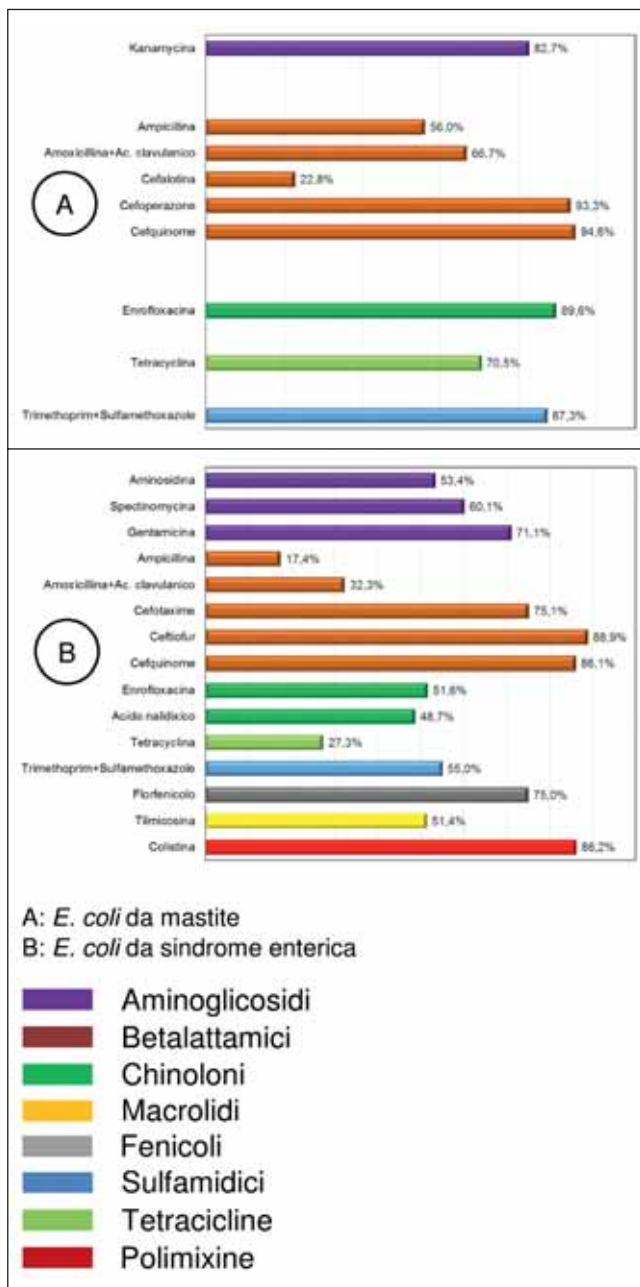


Figura 2 - Ceppi di *E. coli* isolati da mastite o da sindrome enterica. Percentuali medie di sensibilità nei confronti delle diverse molecole.

90% degli isolati è rappresentato da batteri Gram-positivi che presentano una distribuzione delle percentuali di ceppi S significativamente più elevata ($p < 0,05$) rispetto al gruppo dei Gram-negativi (79,8% vs 72,5%).

I microrganismi di origine ambientale (*S. dysgalactiae*, *S. uberis* e coliformi) sono quelli più rappresentati (46,1%), seguiti dai contagiosi (SCP, *S. agalactiae*; 34,7%) e dagli opportunisti (SCN; 19,2%). In queste tre classi, la percentuale media di ceppi sensibili è stata, rispettivamente, del 70,7%, 85,6% e 86,7% mostrando una differenza statisticamente significativa della distribuzione dei valori percentuali di S dei gruppi a confronto ($p < 0,01$).

In Figura 3 vengono riportate le percentuali medie di sensibilità e relativo intervallo di confidenza al 95% dei diversi generi o aggregazioni batteriche.

Nel dettaglio, per quanto riguarda il gruppo degli SCP i valori più bassi della percentuale media ponderata di sensibilità sono stati osservati nei confronti dei betalattamici

(84,6%), delle tetracicline (88,7%) e dei macrolidi (89,7%). Per i betalattamici, è stato osservato un ampio range di variabilità della sensibilità (57,8-99%; Fig. 1a) in funzione del tipo di molecola, con valori particolarmente bassi per le penicilline naturali (penicillina G, 57,8%) e per le aminopenicilline (ampicillina, 65,9%). Valori superiori si osservano per il gruppo delle molecole penicillinasi-resistenti (oxacillina, 95,8%) e delle penicilline associate ad inibitori delle β -lattamasi (amoxicillina + ac. clavulanico, 92,7%). Per le cefalosporine, sono stati osservati valori di sensibilità media maggiori per quelle di I generazione (cefalotina, 99%), rispetto a quelle di III (cefoperazone, 90%) e di IV (cefquinome, 95,9%). Per questi microrganismi, le classi di antibiotici maggiormente efficaci *in vitro* risultavano sulfamidici e rifamicine, con percentuali di sensibilità media rispettivamente del 98,1% e 98,3%.

Nel 2014, la sensibilità dei ceppi di SCP nei confronti dell'oxacillina (97,5%) è risultata significativamente diversa ($p < 0,013$) rispetto a quella media osservata nel quadriennio precedente (95,5%) (Tab. 1).

Per il gruppo degli SCN i valori più bassi della percentuale media ponderata di sensibilità sono stati osservati nei confronti di tetracicline (80,6%), betalattamici (82,2%), macrolidi (88,8%) e chinoloni (90%). Per quanto riguarda i betalattamici, anche per gli SNC si osserva un ampio range di sensibilità (53,0-97,9%, Fig. 1b) in funzione del tipo di molecola; all'interno di questa categoria di antibiotici le percentuali medie di sensibilità inferiori appartengono al gruppo delle penicilline naturali (53,0%) e delle aminopenicilline (60,9%), mentre valori decisamente superiori si osservano per il gruppo delle penicilline associate ad inibitori delle β -lattamasi (96,8%). È possibile osservare una percentuale media di sensibilità all'oxacillina nettamente inferiore (78,1%) rispetto a quella riscontrata per gli SCP (95,8%). Per quanto riguarda le cefalosporine, sono stati osservati valori di sensibilità simili per le molecole delle diverse generazioni (cefalotina, 97,6%; cefoperazone, 95,6%; cefquinome, 97,9%). Per questi microrganismi, le classi di antibiotici maggiormente efficaci *in vitro* sono risultate le seguenti: sulfamidici (95,9%), rifamicine (95,6%) e aminoglicosidi (95,5%).

Relativamente a *Streptococcus agalactiae* i valori della percentuale media ponderata di sensibilità più bassi sono stati osservati nei confronti di aminoglicosidi (3,7%), chinoloni (22,1%), sulfamidici (53,2%) e tetracicline (54,4%). Anche per questo agente eziologico è stato osservato un ampio range di sensibilità nei confronti dei diversi betalattamici (45,7-99,1%; Fig. 1c); in questa categoria di antibiotici, le percentuali medie di sensibilità inferiori sono state osservate per l'oxacillina (45,7%), mentre valori decisamente più elevati si osservavano per le penicilline naturali (84,5%) e le aminopenicilline (73,1%). Nettamente superiori sono le percentuali medie di sensibilità nei confronti di amoxicillina + ac. clavulanico (98,1%) e cefalosporine di IV generazione (cefquinome, 97,7%). Le molecole più efficaci *in vitro* risultavano essere le cefalosporine di I (cefalotina, 99,1%) e di III generazione (cefoperazone, 98,8%). Per *Streptococcus agalactiae* le classi di antibiotici maggiormente efficaci *in vitro* erano i betalattamici (86,0%) e rifamicine (92,1%).

Per *Streptococcus dysgalactiae* (Fig. 1d) i valori della percentuale media ponderata di sensibilità più bassi sono stati riscontrati nei confronti di tetracicline (10,0%), aminoglicosidi (11,3%) e chinoloni (31,5%). Per questi microrganismi, le

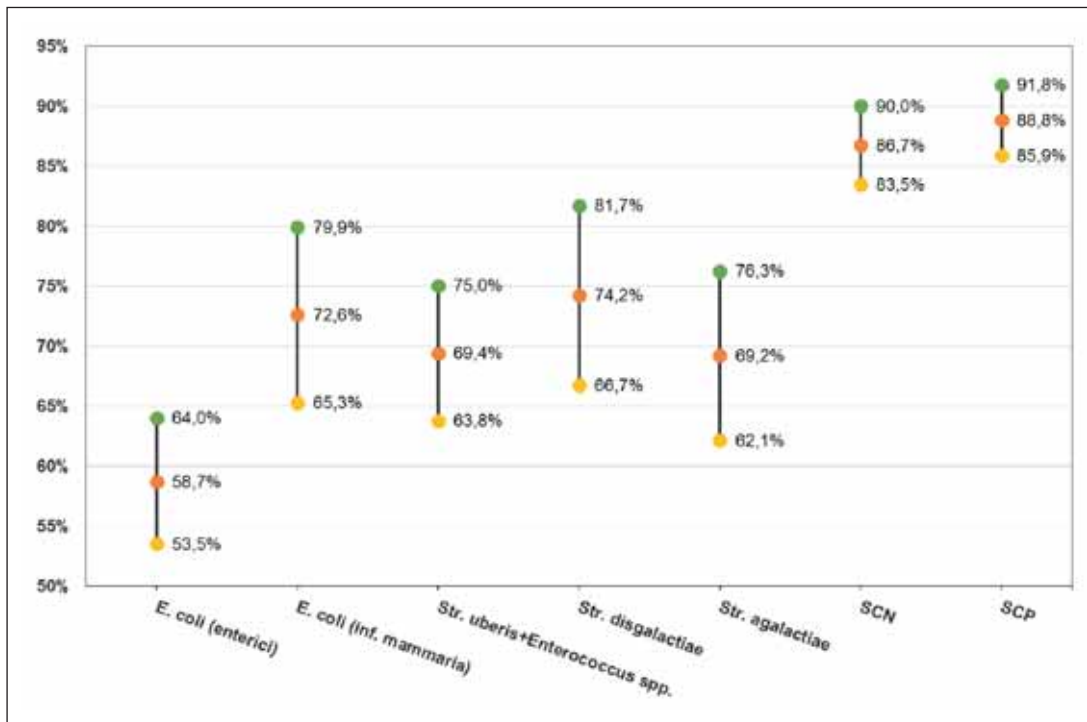


Figura 3
Percentuali medie di sensibilità e relativo intervallo di confidenza al 95% dei diversi gruppi batterici testati.

classi di antibiotici maggiormente efficaci *in vitro* sono stati betalattamici (93,7%) e rifamicine (91,7%).

Nel gruppo *Streptococcus uberis* e *Enterococcus* spp., i valori più bassi della percentuale media ponderata di sensibilità sono stati osservati nei confronti degli aminoglicosidi (19,9%), antibiotici con spettro d'azione orientato prevalentemente verso le *Enterobacteriaceae* e solo alcuni bacilli Gram-positivi, chinoloni (35,5%), all'interno dei quali solo i fluorochinoloni risultano efficaci verso i microrganismi Gram-positivi, e tetracicline (37,2%). Le percentuali di sensibilità risultavano invece nettamente superiori per i macrolidi (65,7%). Per i betalattamici, anche in questo caso è stato osservato un ampio range di sensibilità (51,6-98,5%, Fig. 1e) in funzione del tipo di molecola; le percentuali medie di sensibilità inferiori sono state osservate per l'oxacillina (51,6%), mentre valori maggiori si registrano per le penicilline naturali (86,3%) e per le aminopenicilline (82,2%). Percentuali di sensibilità superiori sono state osservate per amoxicillina + ac. clavulanico (98,5%), e cefalosporine di IV generazione (cefquinome, 93,8%); leggermente meno efficaci *in vitro* risultano le

cefalosporine di I (cefalotina, 90,3%) e di III (cefoperazone, 91,7%) generazione. Per questi microrganismi, le classi di antibiotici maggiormente efficaci *in vitro* sono state le rifamicine (82,4%) e i betalattamici (85,5%).

I dati relativi a *E. coli* fanno riferimento a 1175 ceppi di origine enterica e 1467 ceppi di origine mammaria. Per quanto riguarda i ceppi di origine enterica (Fig. 2b), i valori della percentuale media ponderata di sensibilità più bassi sono stati osservati per le tetracicline (27,3%), chinoloni (50,1%) e macrolidi (51,4%); per quelli isolati da sindrome mammaria (Fig. 2a) betalattamici (64,7%) e tetracicline (70,5%). Fra i betalattamici si è evidenziato un ampio range di sensibilità per entrambe le tipologie di ceppi (22,8-94,6% per i ceppi isolati da mastite e 17,4-88,9% per quelli enterici) in funzione del tipo di molecola. Per i ceppi isolati da casi di sindrome enterica, le molecole testate presentano percentuali di sensibilità media decisamente inferiori (ampicillina, 17,4%; amoxicillina + ac. clavulanico, 32,3%) rispetto a quelli mammari (ampicillina, 56,0%; amoxicillina + ac. clavulanico, 66,7%). Sempre per i ceppi di origine mammaria,

tra le cefalosporine risulta evidente la differenza tra la sensibilità a quelle di I generazione (cefalotina, 22,8%) e quelle di III (cefquinome, 94,6%), giustificabile con il diverso spettro d'azione. Tra le classi di antibiotici testati, in comune ad entrambi i panel, quelle maggiormente efficaci *in vitro* nel caso dei ceppi enterici risultavano aminoglicosidi (61,2%) e betalattamici (59,5%), mentre per quelli di origine mammaria chinoloni (89,6%) e trimethoprim + sulfamidico (87,3%). La valutazione dell'eventuale variazione della sensibilità nel tempo nei confronti delle cefalosporine dei ceppi di *E. coli* di origine mammaria è stata eseguita prendendo in considerazione la generazione di appartenenza di queste molecole (I e II vs III e IV). Per il

Tabella 1 - Valutazione delle variazioni di sensibilità nel tempo dei ceppi di SCP verso l'oxacillina.

Anno	Sensibili		Resistenti+Intermedi		Totale
	Numero ceppi	(%)	Numero ceppi	(%)	
2010	958	(92,1)	82	(7,9)	1040
2011	867	(96,2)	34	(3,8)	901
2012	843	(96,6)	30	(3,4)	873
2013	909	(97,7)	21	(2,3)	930
Media 2010-13	894	(95,5)	42	(4,5)	936
Valori osservati 2014	637	(97,5) ^a	16	(2,5)	653
Valori attesi 2014	624		29		653

^a Differenza significativa ($p=0,013$) della percentuale di ceppi sensibili rispetto alla media del quadriennio precedente.

Tabella 2 - Valutazione delle variazioni di sensibilità nel tempo verso le cefalosporine di I e II generazione (cefalotina e cefoxitin) di ceppi di *E. coli* isolati da episodi di mastite.

Anno	Sensibili		Resistenti+Intermedi		Totale
	Numero ceppi (%)	Numero ceppi (%)	Numero ceppi (%)	Numero ceppi (%)	
2010	47	(20,0)	188	(80,0)	235
2011	49	(22,7)	167	(77,3)	216
2012	43	(17,1)	208	(82,9)	251
2013	110	(21,3)	406	(78,7)	516
Media 2010-13	62	(20,4)	242	(79,6)	304
Valori osservati 2014	85	(34,1) ^a	164	(69,8)	249
Valori attesi 2014	51		198		249

^a Differenza significativa ($p < 0,001$) della percentuale di ceppi sensibili rispetto alla media del quadriennio precedente.

Tabella 3 - Valutazione delle variazioni di sensibilità nel tempo verso le cefalosporine di III e IV generazione (cefoperazone, cefquinome) di ceppi di *E. coli* isolati da episodi di mastite.

Anno	Sensibili		Resistenti+Intermedi		Totale
	Numero ceppi (%)	Numero ceppi (%)	Numero ceppi (%)	Numero ceppi (%)	
2010	335	(91,3)	32	(8,7)	367
2011	317	(92,7)	25	(7,3)	342
2012	392	(95,4)	19	(4,6)	411
2013	806	(94,7)	45	(5,3)	851
Media 2010-13	463	(93,9)	30	(6,1)	493
Valori osservati 2014	448	(93,7) ^a	30	(8,2)	478
Valori attesi 2014	449		29		478

^a Nessuna variazione significativa ($p > 0,05$) della percentuale di ceppi sensibili rispetto alla media del quadriennio precedente.

primo gruppo (cefalosporine di I e II generazione, Tab. 2), nel 2014 è stata osservata una differenza significativa ($p < 0,001$) della percentuale di ceppi sensibili rispetto al valore medio del quadriennio precedente (20,4% nel 2014 rispetto al 34,1% del quadriennio 2010-13). Per quanto riguarda il secondo gruppo (III e IV generazione, Tab. 3) non viene osservata nessuna variazione statisticamente significativa ($p > 0,05$). Si osserva tuttavia una significativa ($p < 0,001$) maggiore efficacia *in vitro* delle cefalosporine di ultima generazione rispetto alle prime (93,7% vs 34,1%).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti evidenziano una netta predominanza dei batteri Gram-positivi come agenti causali di mastite e una maggiore prevalenza dei batteri ambientali o opportunisti rispetto ai contagiosi. Questa osservazione concorda con quanto riportato da altri autori italiani ed evidenzia come vi sia stata una progressiva riduzione nel tempo della prevalenza di mastiti ascrivibili a patogeni contagiosi¹⁴. In merito a quest'ultima osservazione, è necessario tuttavia considerare che i dati fanno riferimento a campioni provenienti da aree (pianura/collina e montagna) e tipologie aziendali (allevamento intensivo e semi-estensivo) anche molto diverse tra loro e che questi fattori potrebbero aver influenzato i risultati.

Nel gruppo costituito da SCP, è interessante osservare come sia stato evidenziato un ampio range di sensibilità (57,8-99%) ai diversi beta-lattamici, con percentuali medie di sensibilità relativamente basse nel gruppo delle penicilline naturali (penicillina G; 57,8%) e delle aminopenicilline (ampicillina; 65,9%); tali valori risultano leggermente inferiori rispetto a quanto riportato da altri autori¹⁵. Le percentuali di sensibilità superiori riscontrate verso le cefalosporine (90-99%) rispetto alle penicilline possono essere giustificate dal fatto che la resistenza degli stafilococchi nei confronti dei betalattamici è solitamente associata a plasmidi che veicolano dei geni per la produzione di β -lattamasi, le quali sono particolarmente attive verso le penicilline naturali e quelle del gruppo A⁶. In genere, le β -lattamasi sono infatti delle penicillinasi, incapaci quindi di inattivare le cefalosporine, le quali risultano quindi più efficaci delle penicilline, ad eccezione delle molecole di III (90%) e IV generazione (95,9%); queste ultime infatti, nonostante l'ampliamento dello spettro verso i batteri Gram-negativi, manifestano una leggera riduzione dell'azione verso i Gram-positivi rispetto alle molecole di I generazione¹⁶. Inoltre, l'alta percentuale di sensibilità verso l'associazione amoxicillina + ac. clavulanico (92,7%) rispetto alle sole aminopenicilline (65,9%) conferma ulteriormente come negli stafilococchi la resistenza ai betalattamici sia dovuta in massima parte a geni che codificano per la produzione di enzimi in grado di idrolizzare tali antibiotici: essendo infatti l'ac. clavulanico un inibitore competitivo delle β -

lattamasi batteriche, esso svolge un ruolo protettivo nei confronti della molecola antibiotica. Per quanto concerne le penicilline del gruppo M, dette anche penicilline "antistafilococche", rappresentate dall'oxacillina (95,8%), esse sono resistenti all'idrolisi operata dalle β -lattamasi, e riescono perciò ad agire anche sugli stafilococchi β -lattamasi produttori, ad eccezione dei ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti (MRSA). Per tale motivo, l'aumento significativo di sensibilità (da 95,5% a 97,5%) nei confronti di questa molecola osservato nel 2014 rispetto alla percentuale attesa calcolata sulla media del quadriennio precedente rappresenta un'osservazione relativamente tranquillizzante per quanto riguarda l'evoluzione della diffusione di ceppi MRSA come causa di mastite.

Gli SCN sono risultati essere il terzo gruppo di batteri per numero di isolati (19,5%). Questa categoria di patogeni sta assumendo una grande importanza nel panorama internazionale, vista la frequenza sempre maggiore con la quale essi vengono isolati a partire sia da casi clinici che subclinici di mastite. Nonostante alcuni autori tendano a definirli come i patogeni emergenti nell'ambito di questa patologia¹⁷, il significato di tali microrganismi nella patogenesi delle infezioni mammarie rimane ancora motivo di forti discussioni. Esso è infatti messo in dubbio da altri autori¹⁸, i quali hanno evidenziato come il contributo percentuale degli SCN al valore delle cellule somatiche (CCS) nel latte di massa tenda a

ridursi all'aumentare di quest'ultimo. Le infezioni ascrivibili a SCN non eserciterebbero quindi un ruolo principale nell'aumento della CCS in mandrie con problemi importanti di qualità del latte, mentre potrebbero apportare un contributo maggiore a questo dato in allevamenti con CCS <200.000 cellule/ml. Nell'ambito dei betalattamici, la percentuale media di sensibilità alle penicilline antistafilococciche (oxacillina) è risultata del 78,1%, valore decisamente superiore rispetto a quanto riportato da Frey e coll.¹⁹ mentre, per quanto riguarda le tetracicline, la percentuale di sensibilità (80,6%) è simile a quanto evidenziato dagli stessi autori (84,2%). Anche nel caso degli aminoglicosidi (95,5%) e dei sulfamidici (95,9%), risultate le classi di antibiotici maggiormente efficaci *in vitro*, le percentuali di sensibilità sono prossime a quelle riportate da Frey e coll.¹⁹ (rispettivamente 97,6% e 95%).

Per quanto concerne gli streptococchi, la resistenza alla tetraciclina risulta essere, assieme alla resistenza verso macrolidi e aminoglicosidi, il reperto più comune nei test di sensibilità agli antibiotici, come riportato anche da Minst e coll.²⁰. Questi autori²⁰ confermano come, nel trattamento delle infezioni streptococciche, i betalattamici rimangano le molecole d'elezione, sia dal punto di vista dello spettro d'azione, che della sensibilità dimostrata da questi microrganismi verso tale categoria di antibiotici. Inoltre, le basse percentuali di sensibilità osservate nei confronti degli aminoglicosidi (3,7%) sono spiegabili con il fatto che questi farmaci hanno uno spettro d'azione orientato prevalentemente verso le *Enterobacteriaceae* e solo alcuni bacilli Gram-positivi¹⁶, tra i quali gli stafilococchi e gli enterococchi. La terapia contro infezioni streptococciche risulta invece più efficace quando essi sono impiegati in associazione a dei betalattamici⁶.

I ceppi di *E. coli* di origine enterica presentavano, mediamente, percentuali inferiori di sensibilità rispetto a quelli di origine mammaria, in particolare nei confronti di tetracicline (27,3%), chinoloni (50,1%) e macrolidi (51,4%). Come riportato anche da un altro studio²¹, che riporta i dati del programma europeo di monitoraggio della sensibilità agli antimicrobici (VetPath), per i ceppi di origine mammaria le percentuali inferiori di sensibilità sono state osservate nei confronti delle tetracicline e, all'interno della famiglia dei betalattamici, nei confronti delle cefalosporine di I generazione. La differente sensibilità verso le cefalosporine di I generazione (22,8%) rispetto a quelle di III generazione (94,6%) è in parte giustificabile con il diverso spettro d'azione dei due tipi di molecole¹⁶.

Per i ceppi di origine enterica destano preoccupazione le percentuali medie di sensibilità nei confronti dei chinoloni (49,9%), decisamente inferiori rispetto a quelle dei ceppi isolati da sindrome mammaria (89,6%). Una spiegazione di questa diversa sensibilità in funzione dell'origine potrebbe essere legata ad un impiego eccessivo di questo farmaco nel trattamento dei vitelli che, essendo ancora funzionalmente dei monogastrici, tollerano bene la terapia per os. Tuttavia, per confermare questa ipotesi, sarebbero necessari ulteriori studi mediante l'impiego di test biomolecolari che consentano di confermare la presenza di geni di resistenza ai chinoloni in questi batteri.

In considerazione del fatto che spesso in ambito veterinario si assiste ad un abuso di antibiotici ritenuti come critici per la salute umana (CIA - critically important antimicrobials) secondo la definizione data dall'OMS²², risulta necessario va-

lutare con attenzione i risultati riguardanti la sensibilità alle cefalosporine di III e IV generazione dei ceppi di *E. coli* di origine mammaria. Nonostante non si sia notato un aumento statisticamente significativo della sensibilità nei confronti delle cefalosporine di ultima generazione, l'efficacia di queste molecole rimane comunque superiore se confrontata con quella delle generazioni precedenti (93,7% vs 34,1%).

CONCLUSIONI

La resistenza microbica ai chemioterapici rappresenta attualmente uno dei temi più rilevanti e complessi in campo medico-sanitario, coinvolgendo un vasto insieme di meccanismi che si articolano tra loro e che si estendono dalle vie di trasmissione diretta di batteri resistenti e dei singoli geni di resistenza, fino all'impatto esercitato dalla pressione selettiva degli antibiotici su diversi *reservoirs*.

La crescita della resistenza microbica ai chemioterapici, spesso in forma di multi-resistenza, ha due conseguenze importanti: aumenta l'incidenza di microrganismi zoonotici e condiziona in maniera decisiva le scelte terapeutiche, determinando frequentemente un aumento dei costi. È quindi evidente che la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza sia strategia in un'ottica sia di pratica clinica sia di sanità pubblica. Tuttavia, l'efficacia di questi sistemi di sorveglianza deve essere misurata in termini di economicità, sistematicità e diffusione dei risultati. L'applicazione di modelli di sorveglianza semplici, rapidi e a basso costo impiegando i dati acquisiti routinariamente nella pratica diagnostica può fornire informazioni utili al fine di compiere scelte razionali nella selezione e nell'utilizzo delle diverse molecole antibiotiche. Inoltre, la condivisione dei risultati riguardanti il trend dell'antibiotico-resistenza potrebbero aumentare la sensibilità delle diverse figure professionali verso questo fenomeno e favorire in questo senso un utilizzo più responsabile e oculato dei farmaci antimicrobici.

■ Antimicrobial resistance patterns of bovine mastitis pathogens isolated in the north-east of Italy between 2010 and 2014

SUMMARY

Introduction - Bovine mastitis represents a major cause of economic loss in dairy production. As well as the financial implication of this disease, the importance of mastitis in public health should not be overlooked. The extensive use of antibiotics in mastitis treatment has possible implications for human health through an increased risk of antibiotic resistant strains that may enter the food chain.

Aim - The aim of this study was the assessment of the main antimicrobial-resistance (AMR) patterns of bovine mastitis pathogens isolated in the north-east of Italy from 2010 to 2014 during the usual diagnostic activity.

Materials and methods - The isolates tested were identified from individual quarter milk samples, which were collected from cows with clinical and subclinical mastitis and from dairy calves with scour. Milk culture was carried out according to the National Mastitis Council guidelines and the *in vitro* antimicrobial susceptibility was evaluated using agar

disk diffusion method as described by NCLSI guide Vet01-A4. *E. coli* isolated from calves fecal samples were tested for antimicrobial susceptibility with the same method. All isolates were tested with the following antimicrobials: penicillin, ampicillin, clavulanate-amoxicillin, oxacillin, cefoxitin, cephalothin, cefoperazone, cefquinome, spiramycin, kanamycin, tylosin, tyimicosin, trimethoprim + sulphametoxazole, tetracycline, enrofloxacin, and rifampicin.

Results and discussion - In this study, out of 15.926 strains, isolated from bovine milk, 29.5% were Coagulase-positive Staphylococci (CPS), 28.6% *Streptococcus uberis* and *Enterococcus* spp., 19.5% Coagulase-negative Staphylococci (CNS), 9.2% *E. coli*, 7.6% *Streptococcus dysgalactiae*, 5.6% *Streptococcus agalactiae*. Overall, more than 90% of isolates were Gram-positive bacteria with significantly ($p < 0.05$) higher average susceptibility percentages than Gram-negative strains (79.8% vs 72.5%). For CPS, the lowest susceptibility values were reported towards betalactams (84.6%), tetracycline (88.7%) and macrolides (89.7%). Within betalactams, the susceptibility range was wide (57.8-99%): penicillin G (57.8%) and ampicillin (65.9%) had the lowest susceptibility values, whereas oxacillin (95.8%), clavulanate-amoxicillin (92.7%) and cephalothin (99%) showed higher susceptibility. For CNS the least effective antibiotics were tetracycline (80.6%), betalactams (82.2%), macrolides (88.8%) and quinolones (90%). Betalactams showed a wide range of susceptibility: penicillin (53%), ampicillin (60.9%), clavulanate-amoxicillin (96.8%), oxacillin (78.1%), cephalothin (97.6%), cefoperazone (95.6%), cefquinome (97.9%). In CNS high *in vitro* susceptibility was found also towards trimethoprim + sulphametoxazole (95.9%), and aminoglycosides (95.5%). The lowest susceptibility percentages for *Streptococcus uberis* and *Enterococcus* spp. were found towards aminoglycosides (19.9%), quinolones (35.5%) and tetracycline (37.2%). Higher percentages were found for macrolides (65.7%) and trimethoprim + sulphametoxazole (76.7%), while the susceptibility patterns towards betalactams members were the following: oxacillin (51.6%), penicillin G (86.3%), ampicillin (82.2%), amoxicillin-clavulanate (98.5%), cephalothin (90.3%), cefoperazone (91.7%) and cefquinome (93.8%). For *E. coli* the enteric isolates showed lower susceptibility levels compared to mammary ones towards tetracycline (27.3 vs 70.5%), ampicillin (17.4 vs 56.0%), clavulanate-amoxicillin (32.3 vs 66.7%), cefquinome (86.1 vs 94.6%) trimethoprim + sulphametoxazole (55 vs 87.3%).

Conclusions -The assessment of routine laboratory data can provide useful and costless information in order to improve therapeutic protocols and represents an important surveillance tool to investigate the level of antimicrobial resistance in dairy cows population.

KEY WORDS

Mastitis, antimicrobial-resistance, cattle, epidemiosurveillance.

Bibliografia

1. National mastitis, council research committee report (2004). Bovine mastitis pathogens and trends in resistance to antimicrobial drugs. <https://nmconline.org/docs/ResPaper.pdf>
2. Erskine R.J., Bartlett P.C., VanLente J.L., Phipps C.R. (2002). Efficacy of systemic ceftiofur as a therapy for severe clinical mastitis in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 85: 2571-5.
3. Rajala-Schultz P.J., Smith K.L., Hogan J.S., Love B.C. (2004). Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Vet Microbiol*, 102: 33-42.
4. Pol M., Ruegg P.L. (2007). Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *J Dairy Sci*, 90: 262-73.
5. Tikofsky L.L., Barlow J.W., Santisteban C., Schukken Y.H. (2003). A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microb Drug Resist*, 9 Suppl 1: S39-45.
6. Giguere S., Prescott J.F., Dowling P.M., Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 5th ed. 2013, Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell. 683.
7. Bolzoni G., Benicchio S., Posante A., Boldini M., Peli M., Varisco G. (2006). Esame batteriologico del latte. Alcune considerazioni su esecuzione, interpretazione dei risultati e frequenza degli isolamenti. *Large Animal Review*, 12.
8. Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K., Carter G.R., *Clinical Veterinary Microbiology*. 1994, London: Wolfe Publishing.
9. Barberio A., Madinelli R., Segalin C., Vicenzoni G. (2006). Diagnosi batteriologica delle infezioni mammarie da *Staphylococcus aureus* mediante utilizzo di un terreno selettivo e differenziale per Stafilococchi. *Journal of the Italian Association for Buiatrics*, 1: 6.
10. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. CLSI document VET01-A4. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013.
11. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014.
12. CLSI, Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility tests data. Approved guideline 4th Ed. CLSI document M39-A4. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
13. Perla R.J., Carifio J. (2005). Use of the Chi-square Test to Determine Significance of Cumulative Antibigram Data. *Am J Inf Dis*, 1: 162-167.
14. Bertocchi L., Vismara F., Hataway T., Fusi F., Scalvenzi A., Bolzoni G., Zanardi G., Varisco G. (2012). Evoluzione dell'eziologia della mastite bovina nel Nord Italia dal 2005 al 2011. *Large Animal Review*, 18: 51-58.
15. McDougall S., Hussein H., Petrovski K. (2014). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* and *Streptococcus dysgalactiae* from dairy cows with mastitis. *N Z Vet J*, 62: 68-76.
16. Carli S., Ormas P., Re G., Soldani G., *Farmacologia Veterinaria*. Idelson-Gnocchi Editore, Napoli, 2008.
17. Pyorala S., Taponen S. (2009). Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. *Vet Microbiol*, 134: 3-8.
18. Schukken Y.H., Gonzalez R.N., Tikofsky L.L., Schulte H.F., Santisteban C.G., Welcome F.L., Bennett G.J., Zurakowski M.J., Zadoks R.N. (2009). CNS mastitis: nothing to worry about? *Vet Microbiol*, 134: 9-14.
19. Frey Y., Rodriguez J.P., Thomann A., Schwendener S., Perreten V. (2013). Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. *J Dairy Sci*, 96: 2247-57.
20. Minst K., Martlbauer E., Miller T., Meyer C. (2012). Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. *J Dairy Sci*, 95: 6957-62.
21. Thomas V., de Jong A., Moyaert H., Simjee S., El Garch F., Morrissey L., Marion H., Valle M. (2015). Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Int J Antimicrob Agents*, 46: 13-20.
22. WHO, Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 3rd Revision 2011, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf.

fertALTA[®]

0,0040 mg/ml
buserelin



ATI, animali in salute.
www.ativet.it / info@ativet.it



Azienda Terapeutica Italiana A.T.I.
40064 Ozzano Emilia (BO)
Tel. 051 791517 - Fax 051 6512714
www.ativet.it - info@ativet.it



ITINERARIO DIDATTICO IN BUIATRIA GENERAL PRACTITIONER CERTIFICATE IN FARM ANIMAL PRACTICE GPCert (FAP) Cremona, Centro Studi EV

Settembre - Dicembre 2016 • Gennaio - Maggio 2017



**MANAGEMENT AZIENDALE
E PROFESSIONALE**

CREMONA, 29-30 SETTEMBRE 2016

L'ALIMENTAZIONE

**NELL'ALLEVAMENTO DELLA VACCA
DA LATTE E DEL BOVINO DA CARNE**

CREMONA, 20-21 OTTOBRE 2016

**PATHOLOGY ROUND: PROTOCOLLI
CLINICO-DIAGNOSTICI DELLE
PRINCIPALI PATOLOGIE DEL BOVINO**

CREMONA, 17 NOVEMBRE 2016

MASTITI E VACCA IN ASCIUTTA

CREMONA, 14-15 DICEMBRE 2016

QUALITÀ DEL LATTE

CREMONA, 19 GENNAIO 2017

CORSO BASE DI RIPRODUZIONE BOVINA

CREMONA, 16 FEBBRAIO 2017

**L'ALLEVAMENTO DEL VITELLO
E DELLA RIMONTA**

CREMONA, 16 MARZO 2017

**ZOPPIE NEL BOVINO: IL CORRETTO
APPROCCIO PER MIGLIORARE
IL BENESSERE E RIDURRE LE PERDITE
ECONOMICHE**

CREMONA, 12-13 APRILE 2017

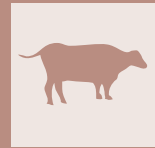
CORSO DI CHIRURGIA DI BASE

CREMONA, 25 MAGGIO 2017

In collaborazione con 

PROGRAMMI SCIENTIFICI E SCHEDA DI ISCRIZIONE:
www.sivarnet.it - Corsi certificati ESVPS 2016 e 2017
INFORMAZIONI: SIVAR - Tel. 0372 - 40.35.39 - info@sivarnet.it

Analisi dei parametri riproduttivi e valutazione dei fattori di rischio per la febbre Q in aziende di bovine da latte



S. MIOTTO*, G. MINOZZI*, G. VALLA†, R. PICCININI*

*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 10, 20133 Milano

†Ceva Salute Animale Italia, Via Colleoni 15, 20864 Agrate Brianza

RIASSUNTO

La febbre Q è una patologia zoonosica diffusa in tutto il mondo, sostenuta da *Coxiella burnetii*. Le vie di trasmissione sono diverse, quella inalatoria è la più frequente negli animali e nell'uomo. L'obiettivo dello studio è valutare la presenza e gestione dei fattori di rischio associati all'infezione, in aziende di bovine da latte nelle province di Como e Lecco (Lombardia) e correlare la presenza/assenza del patogeno con l'andamento dei parametri riproduttivi. I campioni di latte di 83 aziende sono stati esaminati mediante PCR: 28 di queste sono state quindi incluse in uno studio caso-controllo (positive vs. negative). Su un totale di 83 aziende, 16 (19,3%) sono risultate positive a *C. burnetii*. Fra i fattori di rischio, solo il passaggio di greggi sui terreni agricoli delle aziende si è dimostrato significativamente correlato con la positività alla malattia. Sia la frequenza di calori disponibili, sia il periodo parto-concepimento sono risultati statisticamente più elevati nelle aziende positive, rispetto ai controlli. La mancata differenza significativa del numero di aborti nei casi e nei controlli può essere legata alla maggior diffusione di *Neospora caninum* nelle aziende controllo. La fotografia delle aziende infette da *C. burnetii* mostra come le bovine tardino ad essere fecondate, con la conseguenza diretta di una perdita economica notevole. Inoltre sono presenti molti fattori di rischio per l'infezione degli animali e dell'uomo. Da segnalare come quasi la metà delle aziende positive pratica la vendita diretta al consumatore: l'infezione per via digerente è tuttora discussa, però è stato descritto un focolaio di febbre Q in un piccolo gruppo di consumatori abituali di latte crudo. Si postula perciò lo sviluppo di sistemi di controllo efficaci incentrati sulla figura del veterinario aziendale.

PAROLE CHIAVE

Febbre Q, vacca da latte, zoonosi, fattori di rischio, parto-concepimento.

INTRODUZIONE

La febbre Q è una patologia zoonosica diffusa in tutto il mondo. L'agente eziologico è *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) un batterio gram-negativo intracellulare obbligato, che è stato recentemente classificato come agente bioterroristico di tipo B dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Le due caratteristiche principali del microorganismo sono la capacità di eludere il sistema immunitario e l'elevata resistenza ambientale. La prima è dovuta sia all'inibizione delle classiche vie pro-apoptotiche, sia alla sopravvivenza e moltiplicazione del batterio all'interno del fagosoma, impedendone la maturazione¹. Dall'altro lato, *C. burnetii* dimostra un'elevata resistenza ambientale, sopravvivendo più di 5 mesi in acqua a 22°C, ai raggi ultravioletti ed all'essiccamento. Inoltre è stata isolata in più di 40 specie diverse di zecche: queste sono in grado di ospitare il microorganismo per mesi, di trasmetterlo per via verticale alla progenie e per via orizzontale a molti mammiferi, tra cui ratti, ovini, caprini e bovini, e di eliminarlo con le feci, garantendone la sopravvivenza ambientale per almeno 586 giorni. Da segnalare come l'eliminazione del patogeno si prolunghi fino a 20 giorni nelle feci e 54 giorni nel latte, dopo il parto o l'abor-

to². Analizzando il profilo epidemiologico della patologia, sono state dimostrate diverse vie di trasmissione: inalatoria, alimentare, sessuale, verticale e tramite vettori, le zecche appunto. Tra tutte, quella inalatoria è la più frequente sia negli animali da reddito, sia nell'uomo. Anche la via alimentare riveste un'elevata importanza, perché i ruminanti possono infettarsi attraverso l'assunzione di foraggi contaminati da feci di animali infetti, mentre l'uomo può infettarsi tramite l'ingestione abituale di latte crudo infetto. Le vie di eliminazione sono molteplici: latte, urine, feci, secrezioni vaginali e, nell'animale gravido, placenta, fluidi amniotici e membrane fetali³. Tutte le specie appartenenti al regno animale sono sensibili all'infezione. Tuttavia, bovini, ovini e caprini sono i principali serbatoi per lo sviluppo dell'infezione nell'uomo⁴. Da un punto di vista clinico, la malattia presenta spesso un decorso asintomatico e, nelle bovine da latte, causa prevalentemente infertilità, aborto, metriti, endometriti e ritenzioni placentari³.

Nell'uomo, la febbre Q decorre più frequentemente in forma subclinica, solo nel 40% dei casi si manifesta febbre ed una sintomatologia clinica variabile, con polmonite, epatite, aborto, rash cutaneo. Nei pazienti immunodepressi, può esitare in una forma cronica grave, caratterizzata da processi granulomatosi ed endocardite, ad esito spesso fatale⁵. Il principale serbatoio per l'infezione dell'uomo sono i ruminanti: i principali fattori di rischio sono rappresentati dalla vicinanza al bestiame, per cui professionisti come veterinari, al-

Autore per la corrispondenza:
Renata Piccinini (renata.piccinini@unimi.it).

levatori e persone residenti in aree con elevata densità di capi, rappresentano i soggetti maggiormente a rischio di infezione⁶. Attualmente la patologia è diffusa in tutto il mondo ad eccezione della Nuova Zelanda e della regione antartica. È stata segnalata in tutti i paesi della comunità europea, ma il caso più eclatante è stato sicuramente l'epidemia verificatasi in Olanda dal 2007 al 2011, che condusse all'eliminazione di oltre 50000 capi di bestiame (ovini e caprini) e causò migliaia di casi di ospedalizzazione di persone residenti nelle aree coinvolte⁷.

In Italia, recenti studi epidemiologici condotti in aziende di bovine da latte, hanno dimostrato un'elevata prevalenza di febbre Q nelle regioni nord-occidentali⁸. Per quanto riguarda l'Italia meridionale, una conferma indiretta dell'ampia diffusione della malattia è fornita da una recente indagine⁹, che ha documentato un'elevata sieroprevalenza di soggetti positivi fra quelli considerati "a rischio", quali veterinari, macellatori ed allevatori. Tra i focolai umani di febbre Q segnalati nel nostro paese, il più interessante dal punto di vista epidemiologico è quello sviluppatosi in un penitenziario di Como, dove i pazienti avevano contratto la forma clinica dell'infezione tramite aerosol causato da un gregge transumante¹⁰.

Il presente lavoro si pone come corollario di uno studio effettuato negli allevamenti lombardi, che aveva individuato una notevole diffusione di *C. burnetii*¹¹. L'obiettivo è quello di valutare la presenza e gestione dei fattori di rischio associati all'infezione, in aziende di bovine da latte nelle province di Como e Lecco, e quindi di correlare la presenza/assenza del patogeno con l'andamento dei parametri riproduttivi.

MATERIALI E METODI

Il lavoro è stato suddiviso in due fasi. In una prima fase sono stati prelevati campioni di latte di massa in 83 aziende di bovine da latte situate nelle province di Como e Lecco, per valutare il grado di diffusione del patogeno. I campioni di latte sono stati refrigerati (2-8°C) ed inviati all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, dove sono stati conservati in congelatore a $-24 \pm 6^\circ\text{C}$ fino all'esecuzione del test. Come metodica analitica è stata utilizzata la PCR per l'identificazione del segmento 687 bp della regione genomica transpon-like di *C. burnetii*, secondo il protocollo precedentemente descritto⁸.

Nella seconda fase sono stati selezionati 28 allevamenti per uno studio caso-controllo: le aziende sono state definite come "casi" o come "controlli" in base alla positività o negatività a *C. burnetii*. I criteri d'inclusione dei casi e dei controlli nello studio sono stati la posizione geografica e la consistenza dell'allevamento. Per quanto riguarda la posizione delle aziende, abbiamo stabilito che la distanza fra il caso e il rispettivo controllo non fosse superiore ai 12 km, per la capacità di diffusione dell'infezione per via aerea, soprattutto in presenza di vento. Il numero dei capi in lattazione costituisce un'informazione essenziale per il confronto delle aziende, perché spesso la gestione riproduttiva degli animali dipende da scelte collegate con l'imprenditorialità dell'allevatore.

Mediante un questionario (Fig. 1), sono stati quindi raccolti dati anamnestici qualitativi e quantitativi relativi all'anno precedente, durante il quale era stato effettuato il campionamento.

I dati qualitativi riguardano il numero di capi in lattazione, i piani vaccinali aziendali, la presenza di neosporosi, la vendita diretta di latte crudo e i principali fattori di rischio della febbre Q, quali la gestione del parto, la raccolta dei feti abortiti e degli invogli, la gestione delle deiezioni, i piani di derattizzazione e controllo dei volatili e il passaggio di greggi transumanti sui terreni aziendali. I dati quantitativi comprendono i disordini riproduttivi che possono essere correlati all'infezione, cioè il numero di aborti, metriti, endometriti e riassorbimenti embrionali, e i parametri riproduttivi aziendali quali il tasso di rilevamento dei calori (numero di vacche inseminate diviso per le vacche disponibili per l'inseminazione), il tasso di concepimento (numero di bovine gravide rispetto al numero di inseminazioni effettuate), o il numero di calori disponibili (calcolato su tutte le vacche post-parto, dai 50 giorni di attesa volontaria fino alla diagnosi di gravidanza).

Non sono stati effettuati prelievi sul personale di stalla, per motivi di privacy.

L'analisi dei dati è stata effettuata con il software SPSS Statistics 23.0 (IBM, USA, Stati Uniti d'America). In dettaglio, è stata eseguita un'analisi di regressione logistica binaria, dove la variabile dipendente è stata definita come positività o negati-

Indagine epidemiologica per <i>Coxiella burnetii</i> (Febbre Q)			
Azienda			
Via			
Città			
Campione di latte di massa (PCR)	Data prelievo	Risultato	
ANAMNESI AZIENDALE			
Numero di capi in lattazione	<input type="text"/>		
Vaccinazione BVD	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Vaccinazione IBR	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Positività a <i>Neospora caninum</i>	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Vendita diretta di latte crudo	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Presenza di sala parto	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Uso di mascherine e guanti in sala parto	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Raccolta e distruzione feti abortiti e invogli	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Gestione deiezioni (conservazione >3 settimane)	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Greggi in transumanza	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Piano di derattizzazione	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Piano di controllo volatili	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	
Aborti	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	N° <input type="checkbox"/>
Metriti (<21 gg)	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	N° <input type="checkbox"/>
Endometriti (>21 gg)	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	N° <input type="checkbox"/>
Riassorbimenti embrionali	SI <input type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>	N° <input type="checkbox"/>
Tasso rilevamento calori	<input type="text"/>		
Tasso di concepimento	<input type="text"/>		
Calori disponibili	<input type="text"/>		

Figura 1 - Questionario impiegato nella rilevazione dei fattori di rischio per la febbre Q e dei dati riproduttivi, nelle 28 aziende considerate.

vità a *C. burnetii*. I risultati sono stati considerati come statisticamente significativi a valori di $P < 0,05$.

RISULTATI

Complessivamente 16 aziende su un totale di 83 sono risultate positive all'esame PCR effettuato sul latte di massa, con una prevalenza del 19,3%. Nello specifico, nella provincia di Como il valore si attesta sul 15,2% (7 aziende positive su 46), in quella di Lecco sul 24,3% (9 aziende positive su 37; Fig. 2). Tra le aziende positive, 7 (43,7%) effettuano la vendita diretta di latte crudo.

Dai dati relativi alla gestione dei fattori di rischio, emerge la carente gestione del parto, che non si differenzia fra i 2 gruppi di aziende e il generale mancato utilizzo di maschere protettive, mentre solo in 7 aziende su 10 si indossano guanti durante l'assistenza al parto.

Al contrario, è risultato statisticamente significativo il dato inerente al passaggio di greggi su terreni coltivati destinati all'alimentazione delle bovine, che si verifica in 12 casi su 14 (85,7%) e in 7 controlli su 14 (50%; Fig. 3).

Per quanto riguarda i parametri riproduttivi, è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa fra la frequenza di calori disponibili dei casi e quella dei controlli (P

$= 0,026$), con valori molto più elevati nelle aziende positive a *C. burnetii* (6,8% rispetto a 4,1%; Fig. 4).

Ciò nonostante, il periodo che intercorre fra parto e concepimento è risultato significativamente più elevato nelle aziende affette da febbre Q, con valori mediamente superiori di 56 giorni ($P = 0,01$; Fig. 5).

DISCUSSIONE

La prevalenza complessiva della febbre Q riscontrata nel presente studio (19,2%) è molto inferiore rispetto ai risultati di recenti indagini condotte in altre province quali Lodi e Cremona (valori $> 50\%$ ⁸) ed alla stessa media lombarda (41,1%¹¹). Tale discrepanza può essere ascritta al minor numero di allevamenti, a parità di superficie, nelle province prese in esame, ed alla differente consistenza degli stessi, che vede una densità di vacche molto minore rispetto alle altre province lombarde a maggior vocazione zootecnica. Infatti la prossimità delle aziende facilita la diffusione della malattia, mentre la densità di animali è correlata con una maggior quantità di batteri eliminati nell'ambiente. La differente pre-

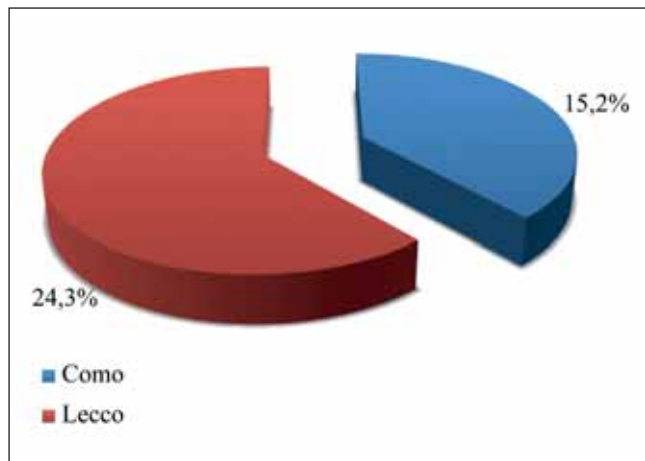


Figura 2 - Aziende positive (%) a *C. burnetii* nelle province di Como e Lecco.

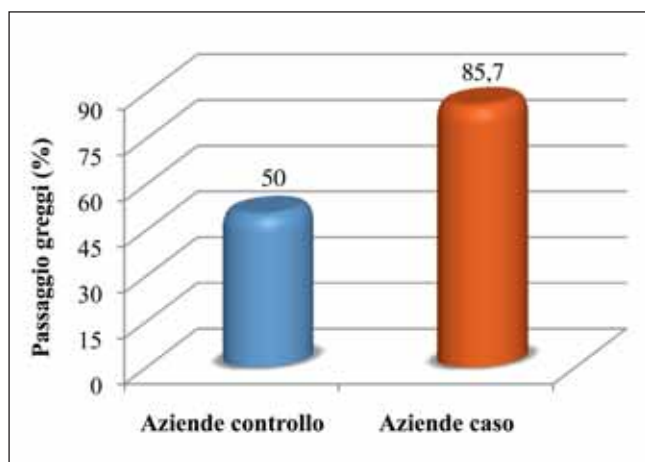


Figura 3 - Passaggio di greggi sui terreni coltivati a foraggi destinati all'alimentazione delle bovine, e positività a *C. burnetii* (%).

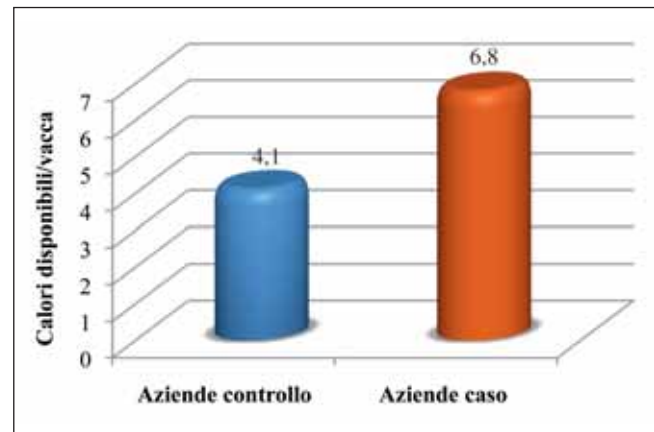


Figura 4 - Numero di calori disponibili/bovina, nelle aziende positive e negative a *C. burnetii*.

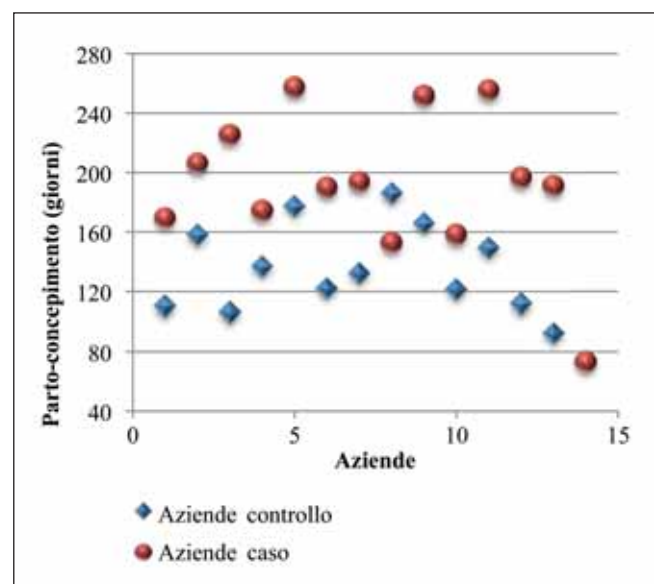


Figura 5 - Distribuzione dei giorni che intercorrono fra parto e concepimento, nelle aziende positive e negative a *C. burnetii*.

valenza dell'infezione tra Como e Lecco, può essere spiegata con la distribuzione delle aziende: nella provincia di Como le positività a *C. burnetii* sono state sporadiche, mentre in quella di Lecco è presente un'area caratterizzata da un'elevata densità di aziende, tutte interessate dalla transumanza di greggi sui loro terreni, la maggior parte delle quali è risultata positiva al microrganismo.

L'analisi relativa alla gestione del parto nelle due province ha dato risultati non soddisfacenti. In primo luogo, attualmente un'azienda su 2 non ha una sala parto. Per motivi di scarsa razionalizzazione degli spazi, le bovine partoriscono nel box delle asciutte o nell'area infermeria, che spesso non è sufficientemente pulita, aumentando così il rischio di diffusione della malattia. L'utilizzo di mezzi di protezione personale durante l'assistenza al parto, è solo parzialmente soddisfatto, poiché la quasi totalità degli allevatori dichiara di usare i guanti, ma nessuno utilizza la mascherina per proteggersi dall'inalazione del batterio. Purtroppo non è stato possibile indagare la sieropositività degli allevatori e del personale aziendale, per motivi di privacy e di consenso. Infine le placente ed i feti abortiti vengono gestiti generalmente in modo scorretto, essendo gettati nella fossa di raccolta dei liquami. È tuttavia emerso come siano rispettati i tempi minimi di stoccaggio dei liquami, se non in rari casi in cui l'azienda non dispone di una vasca di raccolta di dimensioni adeguate.

Fra i principali fattori di rischio della febbre Q, vi sono il controllo dei ratti e dei volatili: nell'area di studio sono effettuati ovunque piani di derattizzazione molto validi, mentre non esistono sistemi efficienti per il controllo dei volatili, se non l'abbattimento da parte di cacciatori. Un reale problema è invece rappresentato dalla transumanza dei greggi sui terreni adibiti alla produzione di alimenti per le bovine: l'86% delle aziende positive ha dichiarato di aver visto dei greggi pascolare sui propri terreni, a fronte del 50% di quelle negative. Questa differenza significativa conferma come i greggi erranti costituiscano un reale problema di sanità pubblica, rappresentando un serbatoio di malattie non solo per gli animali, ma anche per l'uomo. Come esempio, si può menzionare il focolaio che interessò la casa circondariale di Como, dove furono accertati 96 casi di febbre Q nei detenuti e nel personale della struttura, oltre a numerosi casi in persone che vivevano nei pressi del carcere e in veterinari coinvolti nelle indagini. L'infezione era avvenuta attraverso l'inalazione di polveri trasportate dal vento, provenienti dai campi in cui avevano sostato due greggi di pecore e capre¹⁰.

Passando all'analisi degli eventi riproduttivi, la mancanza di una differenza statisticamente significativa fra il numero di aborti verificatisi nelle aziende caso e nei controlli, può essere legata al *bias* relativo alla diffusione di *Neospora caninum* nelle aziende controllo. Nel gruppo dei controlli, infatti, le aziende positive al parassita erano 8 ed hanno registrato 23 aborti sui 30 dell'intero gruppo, in quello dei casi 6 allevamenti positivi al parassita hanno documentato 26 aborti su un totale di 52. Escludendo questi eventi, il numero di aborti scende a 7 per i controlli e a 26 per i casi. D'altra parte, durante lo studio non sono stati effettuati test su feti abortiti o placente, ma semplicemente è stato chiesto all'allevatore se era stata diagnosticata in stalla la positività a *N. caninum*. Quindi non è possibile né concludere che questi aborti siano stati causati solamente da uno dei due agenti patogeni, né escludere una co-infezione da *N. caninum* e *C. burnetii*.

I risultati relativi alle metriti e alle endometriti non hanno mostrato alcuna significatività statistica, in contrasto con le conclusioni di uno studio recente che ha dimostrato che gli allevamenti positivi a *C. burnetii* (PCR su latte di massa) hanno una probabilità 2,5 volte maggiore di sviluppare un'incidenza elevata di metriti ed endometriti cliniche¹¹. Il ruolo del batterio nello sviluppo di queste forme cliniche andrebbe ulteriormente approfondito per poter realmente capire quanto siano gravi le conseguenze dell'infezione nel periodo successivo al parto.

Per quanto riguarda i parametri riproduttivi, il numero di calori disponibili è risultato statisticamente superiore nei casi rispetto ai controlli, di fronte a un significativo aumento del periodo di parto-concepimento, che è in media di 192,45 giorni nei casi e di 135,94 nei controlli. In pratica, nelle aziende positive a *C. burnetii*, gli animali arrivano al momento della fecondazione in condizioni tali da portare l'allevatore e il medico veterinario ad aspettare il successivo calore per procedere alla fecondazione. Ciò significa che mediamente nelle aziende positive sono necessari 56 giorni in più per ottenere una gravidanza, in accordo con la correlazione tra febbre Q e aumento del periodo parto-concepimento dimostrata in Spagna¹².

Infine, una nota riguardante la commercializzazione di latte crudo: quasi la metà delle aziende positive pratica la vendita diretta al consumatore. Nonostante la legge non preveda controlli o restrizioni obbligatorie legate alla presenza di *C. burnetii* nel latte, la possibile infezione e lo sviluppo della patologia nell'uomo a seguito dell'ingestione di tale alimento è attualmente un problema controverso. Recentemente infatti, è stata descritta l'infezione in un piccolo gruppo di consumatori abituali di latte crudo, che non avevano avuto contatti con animali o attrezzi dell'azienda dove acquistavano il prodotto¹³. Il problema è ancor più grave, poiché la rete di distribuzione del latte crudo è interprovinciale: ad esempio, alcune aziende della provincia di Lodi, dove il 55% degli allevamenti è positivo a *C. burnetii*⁸, vendono il proprio latte attraverso distributori nelle province di Milano e di Monza e Brianza. D'altra parte, non è prevista la denuncia della malattia negli animali, se non in particolari condizioni epidemiologiche correlate all'infezione nell'uomo, e tale evento è spesso non indagato e non diagnosticato: in assenza di controlli, la lotta contro la diffusione del batterio diventa perciò piuttosto complicata.

CONCLUSIONI

La fotografia delle aziende infette da *C. burnetii*, quale emerge dal questionario, mostra come le bovine tardino ad essere fecondate, si ingravidino ma poi le gravidanze non vadano a termine, con la conseguenza diretta di una perdita economica notevole.

Inoltre nelle province oggetto dello studio sono presenti molti fattori di rischio per l'infezione degli animali e dell'uomo, sia in ambito aziendale, sia extra-aziendale. In azienda, l'errata gestione di placente e feti abortiti e la mancanza di efficaci piani di controllo dei volatili sono due punti critici che non possono essere trascurati. In ambito extra-aziendale, fondamentali sono la circolazione di greggi erranti e la vendita di latte crudo contenente *C. burnetii*. Per questo è necessario lo sviluppo di un sistema di controllo, in cui la figu-

ra del veterinario aziendale potrebbe inserirsi in modo preponderante, date le sue competenze igienico-sanitarie e in materia di sanità pubblica.

Infine, è stato individuato un elevato grado di inefficienza nel sistema di raccolta dati, causato dalla carente diffusione in quest'area di sistemi informatizzati e dall'assenza di linee guida univoche sul metodo di raccolta dei dati in azienda. È una speranza diffusa che questa situazione cambi radicalmente nei prossimi anni, così da poter analizzare in modo scientifico una maggior quantità di informazioni attendibili, al fine di ampliare le nostre conoscenze su patologie ancora scarsamente comprese, come la febbre Q.

■ Analysis of reproductive parameters and evaluation of risk factors for Q fever in dairy herds

SUMMARY

Introduction - Q fever is a zoonosis caused by an obligate intracellular Gram-negative bacterium, *Coxiella burnetii*, and it is diffused throughout the world. The microorganism is able to survive in the environment despite temperature changes and desiccation, and to elude the host immune response. Q fever is typically transmitted by inhalation of contaminated aerosols, and the shedding of the bacterium with milk and feces can last up to 13 months after parturition or abortion.

Aim - The present study investigates the correlation i) among the main risk factors for the disease and the diffusion of the infection in dairy cows in two Lombardy provinces; ii) between presence/absence of Q fever and reproductive disorders.

Materials and methods - Bulk tank milk from 83 dairy herds was screened for *C. burnetii* using PCR, following the protocol previously described⁸. Thereafter, 28 herds were enrolled in a case-control study. Inclusion criteria were the presence (case) or the absence (control) of the infection, herd size and location (case and control were <12 Km apart). A questionnaire was developed and used to collect the data regarding the risk factors for the disease, the presence of neosporosis, the direct purchase of raw milk, the occurrence of abortion and other reproductive disorders. Heat detection rate, conception rate and available heats (calculated on lactating cows, starting from 50 days after parturition) were also recorded. For the statistical analysis, a binary logistic regression was used, with the presence/absence of *C. burnetii* as the dependent variable. The results were considered as significant at *P* values <0.05.

Results and discussion - Overall 16 herds out of 83 tested (19.3%) were infected by *C. burnetii*. Among the risk factors considered, only the presence of flocks grazing on the meadows of the herd was significantly correlated with Q fever. Such result is likely related to the poor hygienic practices used during parturition in all the herds considered but

two. The number of available heats and that of days-open were significantly higher in the cases than in the controls. The data regarding the abortion rate were biased by the presence of neosporosis and the occurrence of abortions caused by the parasite in the control group. It should be highlighted that raw milk was purchased in almost half of the herds in the case group: if the ingestion as a route of infection is still debated, the regular consumption of infected raw milk has been documented as an important risk factor for human Q fever.

Conclusions - Veterinarian and farmer awareness of Q fever should be improved for different reasons: economic ones and reasons related to the public health. On the one side, the presence of Q fever in the dairy cow was significantly associated with an economic loss for the farmer, due to the increased days-open. On the other side, the correlation of flocks grazing on herd meadows with the infection in the dairy cow raises the risk of human infection by aerosol. Finally, a possible risk for the regular consumer of raw milk cannot be ruled out.

KEY WORDS

Q fever, dairy cow, zoonosis, risk factors, days open.

Bibliografia

1. van Schaik E.J., Chen C., Mertens K., Weber M.M., Samuel J.E. (2013) Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol* 11(8): 561-573.
2. Kazar J. (2005) *Coxiella burnetii* infection. *Ann NY Acad Sci* 1063: 105-114.
3. Rodolakis A. (2009) Q Fever in Dairy Animals. *Ann NY Acad Sci* 1166: 90-93.
4. Maurin M., Raoult D. (1999) Q fever. *Clin Microbiol Rev* 12(4): 518-53.
5. Raoult D., Marrie T.J., Mege J.L. (2005) Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis* 5: 216-226.
6. European Food Safety Authority (EFSA) - Scientific opinion on Q fever. *EFSA Journal* (2010) 8(5): 1595.
7. Roest H.I., Tilburg J.J., van der Hoek W., Vellema P., van Zijderveld F.G., Klaassen C.H., Raoult D. (2011) The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol Infect* 139(1): 1-12.
8. Vicari N., Faccini S., Ricchi M., Garbarino C., Decastelli L., Boldini M., Rosignoli C., Dalmaso A., Bronzo V., Fabbi M. (2013) Occurrence of *Coxiella burnetii* in bulk tank milk from northwestern Italy. *Vet Rec* 172(26): 687.
9. Fenga C., Gangemi S., De Luca A., Calimeri S., Lo Giudice D., Pugliese M., Licitra F., Alibrandi A., Costa C. (2015) Seroprevalence and occupational risk survey for *Coxiella burnetii* among exposed workers in Sicily, Southern Italy. *Int J Occup Med Environ Health* 28(5): 901-7.
10. Santoro D., Giura R., Colombo M.C., Antonelli P., Gramegna M., Gandola O., Gridavilla G. (2004) Q fever in Como, Northern Italy. *Emerg Infect Dis* 10: 159-160.
11. Valla G., Bizzarri D., Ferrari G., Busacchini M. (2014) Prevalenza di *Coxiella burnetii* nel latte di massa in allevamenti di bovine da latte e possibile correlazione con problemi riproduttivi. *Large Anim Rev* 20(2): 51-56.
12. Lòpez-Gatius F., Almeria S., Garcia-Ispuerto I. (2012) Serological screening for *Coxiella burnetii* infection and related reproductive performance in high producing dairy cows. *Res Vet Sci* 93(1): 67-73.
13. Signs K.A., Stobierski M.G., Gandhi T.N. (2012) Q Fever cluster among raw milk drinkers in Michigan. *Clin Inf Dis* 55(10): 1387-1389.



*Al cuor
non si comanda
ma all'ORMONE...
SI!*

- LINEA ORMONALI CALIER -



PLUSET
FSH 500 UI - LH 500 UI



Assolutamente unico in efficacia ed affidabilità per l'induzione della superovulazione nei programmi di embriotransfer del bovino



VETECOR 5000 UI
Gonadotropina corionica umana - hCG



La sua particolare purezza assicura la massima efficacia nella terapia delle patologie ovariche



VETEGLAN
D-Cloprostenolo - Prostaglandina Sintetica



Grazie alla sua composizione chimica garantisce la massima affinità per i recettori

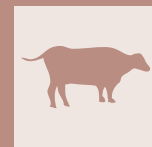


VETERELIN
Buserelin - agonista GnRH



Un prodotto ideale per la gestione in sicurezza dei programmi di sincronizzazione degli estri

An innovative hyperimmune bovine plasma for prophylaxis and therapy of neonatal dairy calf diarrhea - a clinical trial



C. BRESCIANI¹, A. SABBIONI¹, R. CIAMPOLI², M. BERTOCCHI¹, R. SALERI¹, C.S. CABASSI¹, E. BIGLIARDI¹, F. DI IANNI¹, E. PARMIGIANI¹

¹ Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, University of Parma, Via del Taglio 10, 43126 Parma - Italy

² Il Ceppo s.a.s., Via Moneresi 3, 53035 Monteriggioni (SI) - Italy

SUMMARY

Plasma has been recommended empirically as a prophylactic tool in bovine neonatology. The aim of this study was to evaluate the prophylactic and therapeutic efficacy of a new hyperimmune bovine plasma in neonatal bovine diarrhea under commercial dairy conditions. Unlike in other studies, we have purposely imported four healthy Holstein cows from Denmark (classified as a class A country) so that there were no contacts with other cattle belonging to class B countries to produce the plasma. 263 newborn calves were enrolled. The animals were randomly divided in 2 groups: group A (treated), group B (control). The serum total protein concentrations (TP) were checked at 24-30 hours after birth and 24 h post-transfusion, in order to investigate the eventual TP and IgG increase. Group A (n=102) received 300 ml IV of hyperimmune bovine plasma; group B (n=161) were the control group and received a placebo. Both groups showed a TP and IgG serum increase, but for Group A with the lowest first mean values, the increase was higher. 173 calves showed diarrhea: 86 received an antibiotic association, 87 were treated with 300 ml of hyperimmune bovine plasma. The results obtained in the present study showed that the administration of adequately prepared hyperimmune plasma is advisable for the prophylaxis and treatment of neonatal calf diarrhea and it is able to reduce the use of antibiotics.

KEY WORDS

Calf, failure of passive transfer, neonatal diarrhea, therapy, hyperimmune plasma transfusion.

INTRODUCTION

Bovine neonates, as soon, after birth, are subjected to an environment rich in pathogenic as well as opportunistic Gram-negative microbial agents. Since they are born essentially agammaglobulinemic, infectious diseases (diarrhea, bronchitis, pneumonia) remain the major cause of calf morbidity, mortality and economic losses to cattle producers¹⁷. Neonatal mortality is attributed to the presence of infectious agents (eg. *Rotavirus*, *Coronavirus*, *Respiratory syncytial virus*, *enteropathogenic Escherichia coli*, *Pasteurella spp.*, *Salmonella spp.* and *Cryptosporidium* species), along with immunodeficiency typical of the calf, and due to seasonality, congenital defects and poor management conditions. As dairy farms raising thousands animals, usually antimicrobials drugs are added to milk or milk replacers for prophylactic or metaphylactic purpose². Because of concerns that antibiotic use in food animal production has the potential to increase antibiotic resistance in human pathogens, alternative strategies are needed¹⁸. Moreover, the low Ig concentration of calf serum at birth, identified as Failure of passive transfer (FPT), has been associated with a high rate of morbidity and mortality. The FPT "status" is a secondary immunodeficiency characterized by total serum protein (TP) concentration equal or lower than 50 g/L and IgG concentration equal or lower than 10 g/L at 24 hours from birth⁶. It is therefore defined that a high quality colostrum, must submit an IgG concentration >50 g/L, but in the field,

the concentration varies greatly, from 9 g/L up to 186 g/L²⁰. The aim of this study was to evaluate the efficacy of a new hyperimmune bovine plasma obtained from four Holstein cattle imported from Denmark, that underwent to a specific program of hyper-immunization. Denmark is a country classified as A category for bovine infectious diseases, unlike other European countries, as Italy, classified as B category. The plasma used in the present study is different from the others already described in scientific literature for preparation technique also^{3,9,16}. The authors investigated the efficacy of the serum for prophylaxis and therapy of neonatal diarrhea.

MATERIAL AND METHODS

Plasma technique production

The plasma product was derived from 4 healthy female 24 months old Holstein imported from Denmark (category A country for the TSE) in order to have no contact with other cattle and kept isolated (closed herd). The cows were kept in a paddock, fed with hay and grain. Health checks of the donor enlisted: 2 negative serological tests at a distance of 30 days of each other for Tuberculosis, Brucellosis, Leucosis, IBR, BVD, Leptospira, Blue Tongue, Paratuberculosis, Chlamydia, Piroplasmosis, Anaplasma, Q fever and Schmallenberg. In addition, the day of collection the donor was controlled again for the presence of viral genome for BVD, IBR, Blue Tongue and Schmallenberg and lot of production was not released until the negative results of the above cited investigations. In addition the plasma was passed through a 0.1 micron filtration, that retains all bacterial and protozoa agent which are therefore not

Autore per la corrispondenza:
Carla Bresciani (carla.bresciani@unipr.it).

retested at every donation. The donors were subjected to a specific program of hyper-immunization (personal communications, not disclosable) with commercially available vaccines against: *E. coli*, Rota and Coronavirus, Pasteurella, BVD and Clostridium spp. Plasmapheresis was done by cross-flow filtration, followed by sterile filtration disposable kits applied to the machine for collection; the plasma was collected in sterile bags, while the corpuscles of the blood returned to the donor through the use of anticoagulant ACD-A. The plasma was therefore devoid of cells, while minimizing the risk of anaphylactic reactions. The 300 ml plasma bags were frozen at -80°C in one step for 24 hours within 6 hours of collection, then stocked at $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$. Before releasing production lot for administration, in addition to the tests on the viral genome, the tests were made on the same plasma to control the level of total IgG by RID ($> 27\text{ g/L}$), TP $> 50\text{ g/L}$, ACD-A $< 4.73\text{ g/L}$, the absence of endotoxin, sterility (bacteria, moulds and yeasts). The hyperimmune bovine plasma 300 ml bags were produced, stored, frozen and sent to our unit. Then plasma bags were thawed in bain-marie at 35°C at the farm, before the usage. Serum administration procedures were performed on the farm. Administration of 0.3 L (1U) of bovine plasma was performed via jugular vein with 16 G or 14 G catheter (DELTA VEN® 1-DELTA MED® medical device) inserted in a clipped and scrubbed area using transfusion kit (Midial®, medical device industry, Trapani, Italy). Infusion was performed slowly (10 ml/kg/h), and eventual undesirable symptoms were recorded. The plasma administration procedures lasted 20-30 minutes. The ELISA analysis of the sera was carried out at two months intervals during the trial. The sera were assessed using a validated ELISA test (Bovine IgG ELISA Quantitation Set; No.E10118; Bethyl Laboratories®, TX), commercially available.

The clinical trial

The clinical trial was conducted on a 1'300 cow dairy farm in the Northern Italy. The farm produces milk for "Parmigiano Reggiano" cheese and raises calves as its own replacement heifers and veals for meat production. Historically the morbidity rate of neonatal calf diarrhea during the first two week of life was 80%. The study was performed between September 2012 and April 2013. The experimental protocol was approved by Italian Ministry of Health.

Calves were enrolled in the study when the delivery was eutocic and congenital disorders were not present. The vitality of the calves was estimated on a scale from V0 to V3 according to Szenci¹⁵. At birth the calves were weighed and immediately after birth isolated from the dam; within 3 h approximately 2-3 L of colostrum containing IgG more than 25 g/L were administered by staff personnel, according to the farm's own procedures. The dam's first colostrum was obtained, after teats disinfection, using a transportable milking machine, and administered by artificial nipple when the calf made its efforts to stand. The colostrum was administered according to the intake capacity of the newborn. The navel was disinfected with a commercially available spray disinfectant. Subsequently, calves were fed with 2 meals per day of own farm pasteurized milk, while hay, weaning feed and water were constantly available. After the first meal of colostrum the calves were placed in individual straw-bedded boxes. Males were sold at the end of the study, while females were kept in the farm after weaning.

Jugular vein blood samples were taken twice: at 24-30 h and at 48-72 h of life. The first sample (S1), was collected in a te-

st tube of glass, transported to the laboratory where blood serum was collected by centrifugation (2000g for 10 min at room temperature) and evaluated for concentration of total serum protein (TP = g/dl) using a refractometer; the examinations were performed by the same operator. Serum was then collected into suitable tubes, labelled and frozen (-20°C) for subsequent IgG concentration analysis (ELISA).

The evaluation of sera for TP with refractometer allowed us to distinguish and classify subjects with FPT and those with adequate passive transfer (APT). According to the literature, the refractometer cut-off of TP was 5 g/dl^{3,21}. Based on the value of S1 refractometer analysis, 146 calves (62 females, 84 males) were classified as FPT (TP $\leq 5\text{ g/dl}$), and 117 calves (62 females, 55 males) as APT (TP $> 5\text{ g/dl}$). They were randomly divided into 2 groups:

- group A, n. 102: 50 FPT calves (TP $\leq 5\text{ g/dl}$) and 52 APT calves (TP $> 5\text{ g/dl}$), treated with 300 ml of bovine hyperimmune plasma IV, as forward specified;
- group B, n. 161: 96 FPT calves (TP $\leq 5\text{ g/dl}$) and 65 APT calves (TP $> 5\text{ g/dl}$), that received a placebo of 300 ml of saline solution IV.

The second blood sample (S2) was obtained after the transfusion of hyperimmune plasma or the placebo infusion. It was evaluated for TP concentration using a refractometer as previously described, and the serum obtained after centrifugation was frozen (-20°C) for subsequent IgG concentration analysis (ELISA). The data of the analysis of sera performed by ELISA to evaluate the concentration of IgG in the first sampling (S1), were related to the values of the S1 refractometer for each calf, used as a reference to assess the level of immunity.

The plasma administration was performed between the 30th and 48th (mean = 37.6 h) hour of life, the mean weight at birth was 44.35 ± 3.72 . All the calves that met the criteria of inclusion (n. 263) underwent to clinical observation till 30th day of life. The clinical examination of the subjects was performed according to the scheme reported by Berge et al.². The calves were examined daily by farm veterinarians, previously trained to standardize the clinical evaluations, that ignored the group memberships of the animals. They were scored based on the symptoms showed. Animals who reported: respiratory symptoms (bronchitis, pneumonia aspiration pneumonia), ear infections, omphalitis or signs of articular ectasia were excluded from the study to be submitted to the therapy of choice for these pathologies. Within the first week of life 14 (5.3%) calves (10 males and 4 females) were excluded from the study because they were affected by the following pathologies: 6 males and 1 female showed respiratory symptoms (bronchitis), 2 males and 2 females omphalitis, 1 male and 1 female otitis and 1 male articular ectasia. The remaining 249 calves were: 76 healthy (groups A: 30, B: 46); 173 calves showed diarrhea (groups A: 26; B: 104). In subjects affected by neonatal diarrhea, the following clinical parameters were evaluated: diarrhea score, attitude and dehydration. When a subject showed diarrhea (score ≥ 1), it was randomly assigned to one of the following groups:

- antibiotic group (AG): therapy with amoxicillin (140 mg/20 kg) - clavulanic acid (35 mg/20 kg) intramuscularly (Synulox® - Pfizer- Italy);
- hyperimmune plasma group (T2): IV therapy with hyperimmune plasma (300 ml), eventually repeated based on physical condition of the calf.

The 173 subjects with diarrhea were allocated as follow: group AG composed by 86 subjects (41 group A, 45 group B); group T2 composed by 87 subjects (28 group A, 59 group B), treated with bovine hyperimmune plasma. When the diarrhea score reported was ≥ 1 , the meal was composed by a commercial rehydration milk replacer (*Lactolyte - Virbac® - Italy*) administered by bucket with individual calf nipples or, if necessary by a bottle given by the staff. The clinical examinations were repeated daily until diarrhea score became 0 within two consecutive days. The calves had also accessed to hay and clean water ad libitum. During the study every 30 d bacteriological, virological and *Cryptosporidium* investigations were performed on a pool of diarrheal samples (on at least 10 males and 10 females).

Statistical analysis

The data were processed by analysis of variance¹⁴, according to a model that included the presence of the following fixed factors: group (2 levels: A, B), sampling time (2 levels: S1, S2), gender (2 levels: males, females), month of birth (8 levels, September to April), and interaction between group and sampling, and among group, sampling and gender. The calf was considered as the experimental unit.

The data collected from group AG and T2 were subjected to analysis of variance, according to a model that included: group (2 levels: A, B), type of treatment received during the illness (2 levels: AG, T2), gender (2 levels: males, females), month of birth (8 levels, September to April), TP concentration measured using the refractometer during S1 (2 levels: ≤ 5 g/dl; > 5 g/dl), and the interaction among the group during prophylaxis, the group during therapy of neonatal diarrhea.

RESULTS AND DISCUSSION

The means (\pm SE) of TP concentration values at S1 (Table 1) were: for group A 4.49 ± 0.17 g/dl, for the group B was 4.90 ± 0.16 g/dl; while mean values at S2 were 4.82 ± 0.18 g/dl and 5.02 ± 0.17 g/dl respectively. Therefore the intravenous treatment with plasma allowed the treated calves (Group A), which reported a mean initial value statistically lower than the control calves (Group B) to reach values of TP not statistically different in the S2 between the two groups. The means (\pm SE) of the two groups IgG concentrations are shown in table 1 with the same trend.

The data about the illness period were for the group T2: 84 calves recovered completely and 3 animals died; while in the group AG: 83 calves recovered completely and 3 died and there were no statistically differences between the two groups ($P > 0.05$). The overall duration of diarrhea was 3.86 d. In group AG the mean days of antibiotic therapy was 6.31 d; in group T2 the mean of bags used for therapy was 1.18 (Table 2). The agents of neonatal diarrhea isolated from the fecal samples were: *Rotavirus*, *Coronavirus* and *E. coli*. The results reported for clinical parameters were then processed, considering the initial membership of subjects (group A, B). Statistical com-

Table 1 - Concentrations of serum total protein (TP) by refractometer (means \pm SE g/dl) and levels of IgG (means \pm SE g/L) by ELISA in two groups A (Treated) and Group B (Control) of calves.

	Before treatment (S ₁)	After treatment (S ₂)
Refractometer (TP g/dl)		
Group A (n=102 treated)	4.49 \pm 0.17 ^a	4.82 \pm 0.18
Group B (n=161 control)	4.90 \pm 0.16 ^b	5.02 \pm 0.17
ELISA (IgG g/L)		
Group A (n=102 treated)	5.65 \pm 0.75 ^a	5.98 \pm 0.76
Group B (n=161 control)	7.57 \pm 0.52 ^b	7.25 \pm 0.62

^{a-b} Different letters in the same column within the same analytical procedures differ ($P < 0.05$).

Table 2 - Comparison between an antibiotic treatment (clavulanic acid and amoxicillin) (group AG) and hyperimmune plasma therapy Group T2 of 173 dairy calves affected by neonatal diarrhea.

Therapeutic groups	Number and %	Number of treatment (means \pm ES)	Recovered calves n. (%)	Dead calves n. (%)
Group AG (n=86)	86 (49.71%)	6.31 \pm 1.46	83 (96.51%)	3 (3.48%)
Group T2 hyperimmune plasma (n=87)	87 (50.29%)	1.18 \pm 0.8	84 (96.55%)	3 (3.45%)

parison of the least-square means (LS-means) values for the distance between the date of birth and the date of the 1st day with a diarrhea score ≥ 1 was statistically significant ($P < 0.05$), for the group A that received plasma prophylactic treatment (8.71 ± 0.44 d), compared with the group B (6.79 ± 0.31 d). The statistical comparison between the LS-mean values of the two groups for the duration of the enteric pathology (days of diarrhea) was significant ($P < 0.01$), with values equal to 3.03 ± 0.24 d for the calves belonged to the group A and to 4.40 ± 0.17 d for the control group B, the difference was statistically significant ($P < 0.05$) (Table 3). The comparison of

Table 3 - Clinical parameters reported as LS mean \pm ES by the calves in the treatment group and control group related to the prophylaxis.

Clinical parameter	Group A	Group B
Time elapsed between birth and diarrhea (d \pm ES)	8.71 \pm 0.44 ^b	6.79 \pm 0.31 ^a
Days of diarrhea (d \pm ES)	3.03 \pm 0.24 ^a	4.40 \pm 0.17 ^b
Days of antibiotics (d \pm ES)	3.69 \pm 0.52 ^a	6.33 \pm 0.41 ^b
Score 1 ^o d \pm ES	1.87 \pm 0.09 ^a	2.48 \pm 0.07 ^b
Score 2 ^o d \pm ES	1.50 \pm 0.11 ^a	2.30 \pm 0.07 ^b
Score 3 ^o d \pm ES	0.88 \pm 0.12 ^a	1.64 \pm 0.082 ^b
Score 4 ^o d \pm ES	0.38 \pm 0.11 ^a	1.00 \pm 0.08 ^b
Score 5 ^o d \pm ES	0.08 \pm 0.09 ^a	0.59 \pm 0.06 ^b
Score 6 ^o d \pm ES	0.64 \pm 0.08 ^a	0.29 \pm 0.05 ^b
Score 7 ^o d \pm ES	0.11 \pm 0.07	0.16 \pm 0.05
Score 8 ^o d \pm ES	0.04 \pm 0.07	0.12 \pm 0.04
Score 9 ^o d \pm ES	0.005 \pm 0.067	0.09 \pm 0.04
Score 10 ^o d \pm ES	0.004 \pm 0.018	0.003 \pm 0.01

^{a-b} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

the scores from the 1st day of diarrhea, up to the 5th day were highly significant ($P < 0.001$), with positive differences for group B, which reported the maximum value for the 1st day (2.51), then it decreased gradually, and it lost the significance from the 7th day onwards ($P > 0.01$). To assess the effect of the plasma compared to antibiotic treatment, the statistical comparison of the means of the clinical parameters during the follow up were evaluated without considering the immunity levels (Table 4). The duration of diarrhea in correlation to the treatments received (group AG, Group T2) are reported in table 4. The table 4 shows clearly that a prophylactic use of plasma within the first days of life statistically reduced ($P < 0.05$) the persistency of diarrhea. Moreover, in the diarrhoeic calves, if they were previously treated with plasma, the duration of antibiotic therapy was shorter ($P < 0.05$). The overall mean score at day 1 was 2.29. The statistical comparison of the scores between groups from day 1 to day 3 was statistically significant ($P < 0.01$) (Table 3) and it demonstrated that the subjects belonging to treatment group A showed lower scores than the animals from the control group B. The calves in group B that underwent to antibiotic therapy (group AG) reported the longer therapy days (Table 3).

Based on the results obtained we can report that the prophylactic treatment with hyperimmune bovine plasma IV showed a positive effect in reducing the severity of neonatal diarrhea in the calves. The hyperimmune bovine plasma administered as prophylaxis of neonatal diarrhea reduced the use of antibiotics. The bovine hyperimmune plasma treatment was efficient and it could substitute antibiotic therapy as a first tool, decreasing the widespread use of antibiotics during the first month of calf life and furthermore it could reduce the risk of antibiotic resistance in farm animals. The minimum level of IgG necessary to protect a calf from infections depend upon a number of factors, including the types of bacteria in the environment, the management, stress factors and the colostral antibody. The results of Devery *et al.*⁵ and Davis and Drackley⁴ supported the hypothesis that the production of new IgG by the calf starts at 36 h up to 3 weeks of age and about 1 g of IgG1 per day is the rate of the increase of endogenous production. The rate of production is nothuge, probably it is dependent upon the antigenic stress to which the calf is subjected. Moreover, the results of these investigations confirmed that the newborn calves are incapable to absorb colostrum IgG (specifically IgG₁) across the intestinal barrier after about 36 h of age. Current recommendations are to feed 3 to 4 L of high quality colostrum (> 50 g/L IgG and < 100.000 cfu/mL bacteria) to calves within 6 hours from birth to protect against failure of transfer of passive immunity²¹. After the first 24 h of life the IgG remained constant or decreased, and in any case are reduced in the second week of life⁶. In a review conducted by Weaver *et al.*²¹ was reported that the peak serum concentration of immunoglobulins is not de-

tectable up to 32 hours after birth. In fact even if the enterocytes "closure" is approximately at 24 hours post partum, the ongoing transport across the enterocytes, delayed the time of absorption of macromolecules; so the IgG concentration available in the blood does not correspond to is the real amount of the calf. Moreover, the literature reported that there is a gradual decline in the calf of circulating IgG starting 24 hours after the first meal of colostrum during the 3 weeks of life⁶. Arthington *et al.*¹ reported, along with other authors¹³, that the oral administration of large quantities of immunoglobulins did not exchangeable into an increase in serum Ig concentration, but evoked a reduced efficiency of absorption; while if immunoglobulins are administered in small amounts improve the efficiency of absorption. In our study the intravenous administration - but also the intraperitoneal administration is possible - of bovine plasma, between 30th and 48th hour of life, allowed the calves to increase the mean values of TP and IgG serum concentrations (group A). In our opinion this IgG concentration gain was the key for the better clinical parameters reported in calves treated with plasma during the first days of life.

As reported by other authors³ the amount of bovine plasma administered, is chosen based on predictive calculations of absorption of IgG in the blood stream, on concentration of the product, the live weight of the calf at birth and plasma volume estimated, but the kinetics and the plasma half-life of IgG administered IV is not clear. The total volume of blood in animals is equal to 8% of body weight, the plasma is approximately 5%; for this reason in our study we chose the volume of 300 ml of plasma administered at infusion rate of 5-10 ml/kg, whereas the average weights of the Italian Holstein calf vary between 30-50 kg. For further studies we will investigate if an increase is detectable when we administered to FPT calves a greater volume of plasma, or a repeated administration over 24 h, since also the literature reported the possibility to use a higher infusion rate of 40 ml/kg/h in the calf⁹. The literature reported a wide difference in levels of TP and Ig concentrations in newborn calves, that protect against disease. As reported by Furman-Fratczak *et al.*⁷ at 24 h of life, a diagnosis of FPT in calves occurs when the serum IgG concentration is < 10 g/L^{20,21}. Moraes *et al.*¹² estimated that the level of passive transfer in calves using a turbidity test and established that FPT occurs in calves with a serum Ig concentration < 5 g/L. In contrast to the studies in foals, in calves partial failure of passive transfer is rarely described and is underestimated in practice. Gungor *et al.*⁸ stated that after the period of passive transfer, Ig levels < 8 g/L indicate FPT in calves and concentrations between 8 and 16 g/L indicate only partial FPT. In properly protected calves, serum Ig levels should exceeded 16 g/L. The level of risk differs in calves with FPT and partial FPT and influences the efficiency of treatment. Concerning to the literature it is not clear which is the univocal cut-off and analytical procedures to investigate TP and IgG

concentrations, we decided to choose a value for TP concentration evaluated with refractometer, more feasible in a dairy farm condition, to classify immunity levels of calves enrolled, and then verify which was the correspondence with ELISA method in our calves population. The immunity levels of calves enrolled in our study was low. The half-life of maternal IgG

Table 4 - Clinical parameters reported by the diarrhoeic calves related to first grouping and therapy groups.

First Grouping	A		B	
	Antibiotic group (AG)	Plasma therapy T2	Antibiotic group (AG)	Plasma therapy T2
Days of diarrhea	3.25±0.34 ^a	2.82±0.32 ^a	5.36±0.26 ^b	3.45±0.23 ^a
Days of antibiotics	3.69±0.52 ^a	(*)	6.33±0.4 ^b	(*)

^{a-d} Means within a row with different superscripts differ ($P < 0.05$).

in the calf is 20 days, while for immunoglobulins administered with the plasma is not known. A better understanding of the kinetics and especially if exist a possible catabolism of immunoglobulins would be necessary. A study focused on the possible effects of stimulating the immunity of the newborn calf transfused with hyperimmune bovine plasma could be an achievement. Chirgerwe and Tyler³ did not investigate the possible influence of treatment with serum administered intravenously on the future health of the calves. In our study groups that received treatment with plasma as prophylaxis distinguished for better clinical performance. The plasma administered also contains other factors than immunoglobulins (coagulation, complement, mediators such as cytokines or interleukins, etc.) that might act as “stimulant” on the immune system of the newborn calf. Selim *et al.*^{16,17} performed a study using hyperimmune plasma and plasma containing antibodies against membrane antigen of J5 *Escherichia coli* inoculated subcutaneously, resulting in a significant increase in antibody titer in the treated animals. Chirgerwe *et al.*³ administered plasma produced in Colorado, intravenously in 17 newborn calves without getting a significant increase in serum IgG of treated animals. In any case, the previous studies did not evaluate the clinical efficacy of treatments. The administration of plasma remains the treatment that should maximize the therapeutic possibilities in newborn calves FPT after 24 hours of life, when the transport of macromolecules in the intestinal epithelium is no longer possible¹⁹. In our study the treatment with bovine plasma improved the immune protection of calves and it get the advantage that it can be administered over the 24 hours of life. Lakritz *et al.* demonstrated that neutrophilic function are decreased in calves that failed to absorb colostrum lactoferrin, suggesting that soluble mediators absorbed from colostrum enhance the immunologic capabilities of the newborn¹¹. Since overall contribution of soluble factors and cellular transfer in the neonatal immune response remains to be completely elucidate, further study are necessary to investigate the eventually effects of plasma transfusion in newborn calves immunological functions. In our study there have been no undesirable reactions, as reported in other studies³. The international medical community, institutions and consumers of food of animal origin increase the need for a drastic reduction in the use of antimicrobials in intensive farming and development is encouraged and the focus on the management techniques that minimize the use of antibiotics. Under this point of view, an adequate management of a calf, and the possibility of effective products available on the market, which enhance passive immunity of the newborn calf are of crucial importance in dairy cow industry. When high-quality colostrum is not available, the use of plasma transfusion is advisable. Since it has been extensively demonstrated that a high level of colostrum immunoglobulins in the serum of calves improves not only their health and growth in the first weeks of life, but also their further use as cows¹⁰; the use of a plasma product transfusion as prophylactic tool is a good, not only on time of birth limited, treatment for the newborn calves.

CONCLUSIONS

Based on the results the prophylactic treatment with hyperimmune bovine plasma IV showed a positive effect in reducing the severity of neonatal diarrhea in the calves. At last we

reported a significant reduction of days of antibiotic therapy. In the study 83/87 (96.55%) of the animals were recovered by the treatment with plasma, demonstrating its effectiveness in the treatment of neonatal calf diarrhea. The hyperimmune bovine plasma allowed us to reduce the use of antibiotics during the clinical trial. The present study showed that the bovine hyperimmune plasma treatment is efficient and can substitute antibiotic therapy as a first tool, decreasing the widespread use of antibiotics during the first month of calf life and reducing the risk of antibiotic resistance in farm animals.

References

1. Arthington J.D., Cattel M.B., Quigley J.D. (2000) Effect of dietary IgG source (Colostrum, Serum, or milk derived supplement) on efficiency of Ig absorption in newborn holstein calves. *J Dairy Sci*, 83: 1463-1467.
2. Berge A.C.B., Lindeque P., Moore D.A., Sischo M. (2005) A Clinical Trial Evaluating Prophylactic and Therapeutic Antibiotic use on health and performance of preweaned calves. *J Dairy Sci*, 88: 2166-2177.
3. Chirgerwe M., Tyler J.W. (2010) Serum IgG concentration after Intravenous serum transfusion in a randomized clinical trial in dairy calves with inadequate transfer of colostrum immunoglobulins. *J Vet Internal Med*, 24: 231-234.
4. Davis C.L., Drackley J.K. (1998) Colostrum. In: *The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf*. 179-206, Iowa State Univ. Press, Ames, IA.
5. Devery J.E., Davis C.L., Larson B.L. (1979) Endogenous production of immunoglobulin IgG1 in Newborn Calves. *J of Dairy Sci*, 62: 1814-1818.
6. Franklin S.T., Amaral Phillips D.M., Jackson J.A., Campell A.A. (2003) Health and performance of Holstein calves that suckled or were hand-fed colostrum and were fed one or three physical form of starter. *J Dairy Sci*, 86: 2145-2153.
7. Furman-Fratczak K., Rzata A., Stefaniak T. (2011) The influence of colostrum immunoglobulin concentration in heifer calves serum on their health and growth. *J Dairy Sci*, 94: 5536-5543.
8. Güngör Ö., Bastan A., Erbie M.K. (2004) The usefulness of the γ -glutamyltransferase activity and total proteinemia in serum for detection of the failure of immune passive transfer in neonatal calves. *Rev Med Vet*, 155: 27-30.
9. Hunt E., Wood B. (1999) Use of blood and blood products. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 15: 641-662.
10. Jarmuz W., Szelag I., Skrzypek R. (2001) Relationship between concentration of blood serum immunoglobulins and growth rate in dairy heifers. *Pr Mat Zoot*, 59: 93-101 (in Polish).
11. Lakritz J., Tyler J.W., Hostetler D.E., Marsh A.E., Weaver D.M., Holle J.M., Stevens B.J., Denbigh J.L. (2000) Effects of colostrum pasteurization (76 C) of serum lactoferrin and neutrophil oxidative burst in calves. *Am J Vet Res*, 61: 1021-1025.
12. Moraes M.P., Weiblen R., Rebelatto M.C., Moraes da Silva A. (2000) Relationship between passive immunity and morbidity and weight gain in dairy cattle. *Ciênc Rural Santa Maria*, 30: 299-304.
13. Quigley J.D. III, Fike D.L., Egerton M.N., Drewry J.J., Arthington J.D. (1998) Effects of colostrum replacement product derived from serum on immunoglobulin G absorption by calves. *J Dairy Sci*, 81: 1936-1939.
14. SAS, 2008, SAS/STAT® User's Guide Version 9.2 Cary, NC: SAS Institute Inc.
15. Szenci O. (1982) Correlations between muscle tone and acid-base balance in newborn calves: experimental substantiation of a simple score system proposed for neonatal status diagnosis. *Acta Veterinariae Academiae Scientiarum Hungaricae*, 30: 79-84.
16. Selim S.A., Cullor J.S., Oelsner I.E. (1995a) Passive immunotherapy in neonatal calves-I. Safety and potency of a J5 *Escherichia coli* hyperimmune plasma in neonatal calves. *Vaccine*, 13: 1449-1453.
17. Selim S.A., Holmberg C.A., Cullor J.S. (1995b) Passive immunotherapy in neonatal calves. II. The efficacy of a J5 *Escherichia coli* hyperimmune plasma as immunotherapy in neonatal calves. *Vaccine*, 13: 1454-1459.
18. Silbergeld E.K., Graham K.J., Price L.B. (2008) Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu Rev Public Health*, 29: 151-169.
19. Staley T.E., Bush L.J. (1985) Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease. *J Dairy Sci* 1985, 68, 184-205.
20. Swan H., Godden S., Bey R., Wells S., Fetrow J., Chester-Jones H. (2007) Passive transfer of immunoglobulin G and preweaning health in Holstein calves for commercial colostrum replacer. *J Dairy Sci*, 90(8): 3857-3866.
21. Weaver D.M., Tyler J.W., VanMetre D.C., Hostetler D.E., Barrington G.M. (2000) Passive Transfer of Colostrum Immunoglobulins in calves. *J Vet Inter Med*, 14: 596-577.



velactis[®]
dove tutto inizia

Per un'asciutta
più facile ed
efficiente

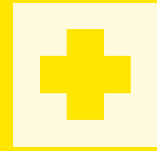


Il primo facilitatore
della messa in asciutta

Ceva Salute Animale S.p.A.
Viale Colleoni 15 - 20864 Agrate Brianza (MB)
Tel. 0396559.442
e-mail: marketing.italy@ceva.com
www.ceva-italia.it



A DNA chip-based method for rapid characterization of *Mycobacterium* isolates



M. BIAGETTI¹, P. MAZZONE¹, M. CIULLO¹, C. SEBASTIANI¹, M.L. PACCIARINI², C. LAUTERIO³, A. DE MONTIS³

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia - Italy

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia - Italy

³ Bcs Biotech S.rl. - Laboratori di Ricerca e Sviluppo, Viale Monastir 112, Cagliari - Italy

SUMMARY

Introduction - One of the major problems for the diagnosis of mycobacteriosis is represented by the slow growth of the causative agents and by biochemical identification tests that often are difficult to interpret and sometimes not decisive. The development of molecular techniques (i.e. PCR) has reduced the time required for the identification of isolates. However, a series of additional analysis such as PCR, PCR RFLP, PFGE, spoligotyping or sequencing are necessary to correctly identify the *Mycobacterium* species.

Aim - The aim of this study was to develop and validate a chip for the rapid identification of *Mycobacterium* isolates.

Materials and methods - A total of 88 mycobacterial isolates from human and animal samples, including 4 ATCC strains and two reference strains, used for the production of bovine and avian tubercolins, were examined by chip-based method. All strains were previously characterized by biochemical and molecular methods. The chip-based method relies on a multiplex PCR followed by the PCR product hybridization on a chip. *M. kansasii*, *M. goodii*, *M. chelonae*, *M. malmoense*, *M. flavescens*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. abscessus*, *M. lentiflavum*, *M. porcinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. thermoresistibile*, *M. chitae* and *M. goodii*, were amplified and used as negative controls.

Results and discussion - The developed device was able to recognize *Mycobacterium* genus (MYC), *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), *Mycobacterium avium* complex (MAC), *M. fortuitum* (FOR), *M. marinum* (MAR), *M. smegmatis* (SME), *M. scrofulaceum* (SCR) and *M. xenopi* (XEN). The concordance between the expected and observed results was 100% with regard to identification of *Mycobacterium* genus, as well as to the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Regarding to Nontuberculosis *Mycobacteria* the concordance was 96%. All the isolates were correctly recognized by the chip with exception of one strain identified as *M. fortuitum* by 16S rRNA gene sequencing. As expected no signal was obtained analysing the negative controls.

Conclusion - The developed device was able to characterize *Mycobacterium* isolates in a single step. It is easy to use, requires basic knowledge of molecular biology and no special equipment is needed. Moreover, it is rapid, sensitive and specific. The device was able to distinguish the MTBC, MAC and NTM. Within the group of MTBC the assay was able to differentiate *M. tuberculosis* from *M. bovis* / *M. caprae* / *M. microti* group. Within MAC it was possible to differentiate the *M. avium sub. paratuberculosis* / *M. avium sub. avium* group from *M. avium subsp. intracellulare*. The device was also able to identify some important pathogenic NTM, such as *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum* and *M. xenopi*.

KEY WORDS

Mycobacteriosis, diagnosis, laboratory techniques.

INTRODUCTION

The genus *Mycobacterium* is traditionally divided into several groups on the basis of their pathogenicity. A first group, so-called tuberculosis mycobacteria belonging to *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC), can cause tuberculosis (TB) in human and animal hosts. Another group consists of Nontuberculous mycobacteria (NTM) that can cause a variety of diseases, although generally they are classified as low pathogenic to humans. The pulmonary diseases are the most frequent, followed by skin diseases and extrapulmonary infections in severely immunocompromised pa-

tients. A separate classification is done for *Mycobacterium leprae*, which presents unique clinical and biological features. Although more than 140 species of NTM have been described, only a reduced number (25 species) has been strongly associated with NTM diseases¹. The remaining species are ubiquitous and can be isolated from environment, including soil, natural and artificial water system^{2,3}. Most of these species are saprophytic bacteria and only occasionally pathogenic. Despite the low pathogenicity for humans, an increasing frequency of NTM isolation has been registered in the last decade, especially in countries where TB incidence is decreasing². Their incidence depends on the presence and distribution in the environment and on the opportunities of contact. The infection usually occurs during surgical or cosmetic procedures, in occasion of accidental wounds in immunosuppressed hosts. Recently,

Autore per la corrispondenza:
Massimo Biagetti (m.biagetti@izsum.it).

opportunistic infections caused by NTM are more frequently reported because of the diffusion of immunodepression in humans as well as in animals, for example for the spread of human immunodeficiency virus (HIV) in many parts of the world, aging of the population, industrial breedings or immunosuppressive therapy in animals. In veterinary field bovine tuberculosis (bTB) deserves particular attention. It is an important zoonosis widespread in the world. In industrialized countries, the incidence of bTB has drastically decreased in cattle and humans because of the bTB eradication programs and the practice of milk pasteurization. In non-industrialized countries, where the control measures are absent or applied sporadically and the pasteurization is limited, bTB in animals is still widely distributed⁴. This pathology is associated with economic and public health effects of remarkable importance and with significant impact respect to the international commerce of animals and animal-derived products. The major agents of bTB are *M. bovis* and *M. caprae* that belong to MTBC⁵. *M. tuberculosis*, *M. africanum* I and II, *M. canettii*, *M. pinnipedii* and *M. microti* are also included into the MTBC.

Biochemical characterization of isolates has been the only and often cumbersome method for the assignment of the species for a long time. Thereafter, several molecular methods have been developed and used for epidemiological and etiopathogenetic studies.

Recently, molecular biology techniques have been demonstrated to be valid not only for the diagnosis but also for the identification of *Mycobacterium* species involved in human and veterinary medicine. A new molecular epidemiological tool for species identification and genotyping of isolates belonging to MTBC is based on the detection of SNPs. However, this method was unable to type some East African - Indian (EAI) strains and Beijing genotypes⁶.

In order to allow a fast molecular characterization of mycobacteria isolates, we developed a new DNA chip and *in vitro* assessed the capability in differentiating most relevant *Mycobacterium* species.

MATERIALS AND METHODS

Mycobacterial strains

A total of 82 DNA extracted from human and animal mycobacterial isolates (27 human, 39 bovine, 7 fish, 1 pig, 8 wild boar strains) were collected from the following Italian sources: Department of Science and Biomedical Technology, Section of Applied Microbiology Cagliari University, IZS Lombardia and Emilia Romagna (IZSLER) and IZS Umbria and Marche (IZSUM).

All samples were previously identified at species level by a combination of phenotypic, biochemical and molecular tests. Four reference strains from ATCC - *M. tuberculosis* ATCC H37RV, ethambutol-resistant *M. tuberculosis* ATCC3583, streptomycin-resistant *M. tuberculosis* ATCC 35820 and *M. bovis* BCG ATCC27291 - and two additional reference strains - *M. bovis* AN5 and *M. avium* D4R, used for the production of bovine and avian tubercolins respectively - were included in the study. All mycobacterial strains were inactivated by heating cultures at 100°C for 30 min. DNA was extracted by High pure PCR template preparation kit (Roche) according to the manufacturer's specifications.

All samples were amplified by a multiplex PCR and assessed by a biochip assay.

Multiplex PCR amplification

A multiplex PCR was performed with specific primers to amplify 16S-23S rRNA locus of *Mycobacterium* spp.⁷ and the genomic direct repeat (DR) locus of MTBC⁸. Five microliters of DNA from each strain were added to 45 µl of PCR reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 200 µM (each) deoxynucleoside triphosphate, 20 pmol of each primer, 1U of Taq DNA polymerase (all reagents were from Roche). The thermal profile was composed of an initial denaturation at 96°C for 2 min and 25 cycles with the following steps: denaturation at 94°C for 60 sec, annealing at 55°C for 60 sec and extension at 72°C for 30 sec.

Biochip preparation

The biochip was realized by spotting specific probes through a piezo - dispensing instrument (Sciencion US Inc). The used probes were from Xiong et al. (2006)⁷ and Kamerbeek et al. (1997)⁸ and are listed in Table 1.

Probe sequences were synthesized to 0.2 µmol synthesis scale, by a 3400 DNA Synthesizer Applied Biosystems and Applied Biosystems reagents. Probes were for: *M. avium* complex (AVI), *M. marinum* (MAR), *M. scrofulaceum* (SCR), *M. xenopi* (Xen), *M. fortuitum* (FOR), *M. intracellulare* (INT), *Mycobacterium* genus (MYC), *Mycobacterium tuberculosis* complex: (MTBC); *M. smegmatis* (SME), 1° (DR) spacer spoligotyping (SP-F310A), 39° (DR) spacer spoligotyping (SP-F670A), 40° (DR) spacer spoligotyping (SP-F680A), 41° (DR) spacer spoligotyping (SP-F690A), 42° (DR) spacer spoligotyping (SP-F700A), 43° (DR) spacer spoligotyping (SP-F710A). All probes were synthesized with a 5' poly-T tail of 20 bp to allow binding to the biochip. Each probe has been suspended in TE buffer pH 8.1 and diluted to a concentration of 5 ng/µl.

The probes were spotted in a grid with fixed position inside a support as shown in Fig.1. The plates were then subjected to a controlled UV irradiation by Bio-Link®, to stabilize the probe-support binding and then stored at 4°C.

Biochip assay

Synthetic biotinylated DNA oligonucleotides, complementary to the probes fixed on the chip, were prepared to be used to test the sensitivity of the device and the diagnostic efficiency of the probes.

An aliquot of 20 µl of each multiplex PCR product, was heated at 95°C for 10 min and then immediately chilled on ice. Amplicons were then hybridized on the chip in an appropriate buffer. Hybridization with specific probes spotted in required positions, was performed at 60°C for 1 hour. The biochip was incubated in phosphatase alkaline streptavidin conjugate (Roche) at room temperature (RT) for 30 min. Then the biochip was incubated in nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate solution (NBT/BCIP - Roche) for 15 min at room temperature in the darkness. BCIP is the Alkaline Phosphatase-substrate, which reacts further after the dephosphorylation to give a dark-blue indigo-dye as an oxidation product. NBT serves as the oxidant and yields also a dark-blue dye. The reading and interpretation of the hybridization pattern was performed by a BioChip reader and dedicated software (bcs Biotech) (Fig. 1).

Table 1 - Primers and probes used in this study.

PRIMER	Sequence 5'- 3'	PROBE	Sequence 5'- 3'
DRa	GGTTTTGGGTCTGACGAC	1° DR	ATAGAGGGTCGCCGGTTCTGGATCA
DRb	CCGAGAGGGGACGGAAC	39°DR	GACGATGGCCAGTAAATCGGCGTGG
		40°DR	CGCCATCTGTGCCTCATAAGGTCC
		41°DR	GGAGCTTTCGGCTTCTATCAGGTA
		42°DR	ATGGTGGGACATGGACGAGCGCGAC
		43°DR	CGCAGAATCGCACCGGTGCGGGAG
Sp1	ACCTCCTTCTAAGGAGCACC	FOR	ACAAACTTTTTGACTGCCAGACAC
Sp2	GATGCTCGCAACCACTATYCA	INT	GGTCGATCCGTGTGGGTCC
		SME	AACGTTGAGATGCGGTGTGGT
		MTBC	TGCATGACAACAAAGTTGGCC
		MYC	GTGGTGGGGTGTGGTGTGGT
		AVI	AACACTCGGTCCGTCCGTGT
		MAR	AACATCTCTGTTGGTTTCGG
		SCR	ACTCGGCTGTTCTGAGTGGT
		XEN	TGTTGGGCAGCAGGCAGTAAC

To verify the selectivity of the device, the diagnostic efficiency of the probes and the specificity of the amplified products in multiplex PCR, DNA from *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*, was PCR - amplified with primers Sp1 and Sp2⁷.

DNA from *M. kansasii*, *M. goodnae*, *M. chelonae*, *M. malmoense*, *M. flavescens*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. abscessus*, *M. lentiflavum*, *M. porcinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. thermoresistibile*, *M. chitae* and *M. gadium*, was also amplified and used as negative controls.

RESULT

Reference strains

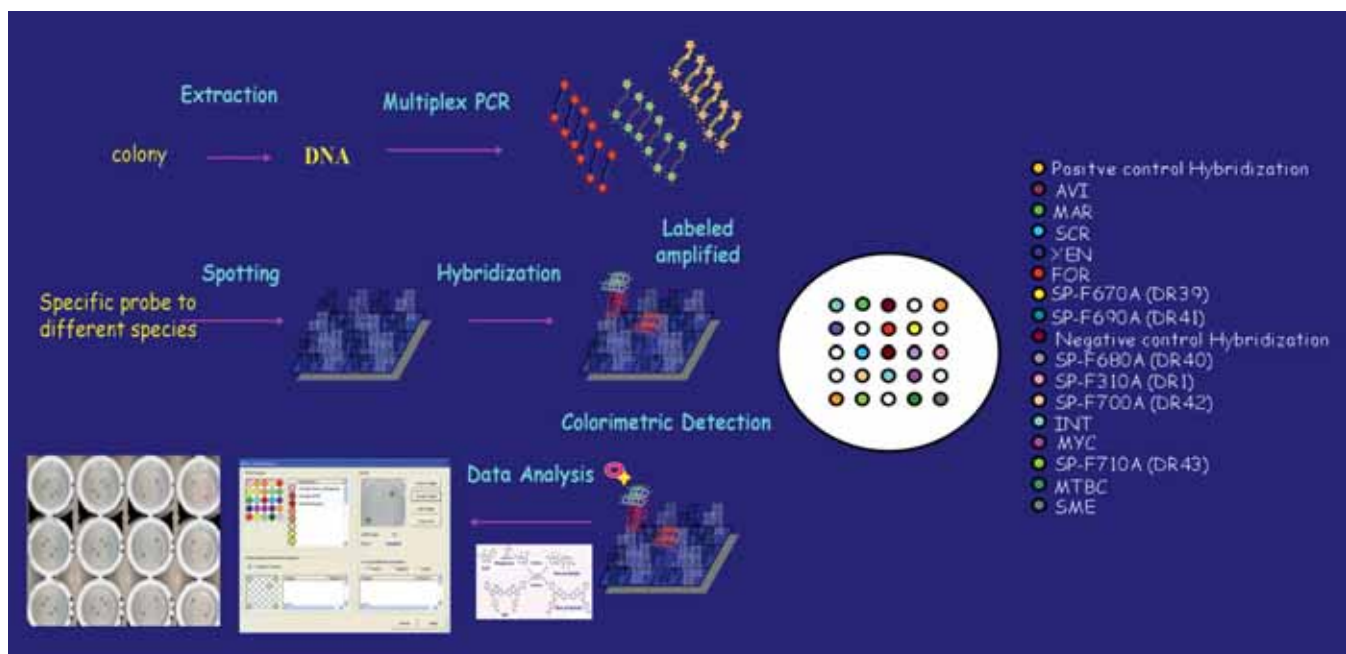
The ATCC reference strains, as well as *M. bovis* AN5 and *M. avium* D4R strains, were correctly identified by the device. We detected positive signals with the probes MYC, MTBC, and for all the DR spacers for *M. tuberculosis* (ATCC H37Rv); with the probes MYC, MTBC and the DR spacers from 39 to 42 for the streptomycin-resistant *M. tuberculosis* strain (ATCC 5820) and the ethambutol-resistant *M. tuberculosis* strain (ATCC 3583); with the probes MYC, MTBC and the first 1° DR spacer, for *M. bovis* AN5 and BCG; with the probes MYC and AVI in the case of *M. avium* D4ER.

Field strains

Eighty-two strains of human and animal origin were positive to MYC, classifying all strains within the *Mycobacterium* genus (Tab. 2).

We detected positive signals with the probe MYC, MTBC, and for all the DR spacers for *M. tuberculosis*; with the probes MYC, MTBC and the first 1° DR spacer for 14 *M. bovis* strains, and with the probes MYC and MTBC for *M. caprae*, *M. microti* and four *M. bovis* strains.

M. avium subsp. *avium*, *M. avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* were positive with the probes MYC and AVI. *M.*

**Figure 1** - Workflow of method and specific pattern hybridization.

AVI: probe for *M. avium* complex; MAR: probe for *M. marinum*; SCR: probe for *M. scrofulaceum*; Xen: probe for *M. xenopi*; FOR: probe for *M. fortuitum*; INT: probe for *M. intracellulare*; MYC: probe for *M. genus*; MTBC: probe for *M. complex*; SME: probe for *M. smegmatis*; SP-F310A: 1° DR spacer spoligotyping; SP-F670A: 39° DR spacer spoligotyping; SP-F680A: 40° DR spacer spoligotyping; SP-F690A: 41° DR spacer spoligotyping; SP-F700A: 42° DR spacer spoligotyping; SP-F710A: 43°DR spacer spoligotyping.

Table 2 - Continuation.

Strain	species	Probe MYC	Probe MTBC	Probes DR*	Other probes**
<i>M. scrofulaceum</i>	human	+	-	-	SCR
<i>M. smegmatis</i>	human	+	-	-	SME3
<i>M. smegmatis</i>	bovine milk	+	-	-	SME
<i>M. xenopi</i>	human	+	-	-	XEN
<i>M. xenopi</i>	human	+	-	-	XEN
<i>M. kansasii</i>	bovine	+	-	-	ND
<i>M. kansasii</i>	bovine	+	-	-	ND
<i>M. kansasii</i>	human	+	-	-	ND
<i>M. kansasii</i>	bovine	+	-	-	ND
<i>M. kansasii</i>	human	+	-	-	ND
<i>M. gordonae</i>	human	+	-	-	ND
<i>M. gordonae</i>	human	+	-	-	ND
<i>M. gordonae</i>	human	+	-	-	ND
<i>M. gordonae</i>	fish	+	-	-	ND
<i>M. chelonae</i>	human	+	-	-	ND
<i>M. chelonae</i>	human	+	-	-	ND
<i>M. chelonae</i>	bovine	+	-	-	ND
<i>M. malmoense</i>	human	+	-	-	-
<i>M. flavescens</i>	human	+	-	-	ND
<i>M. szulgai</i>	human	+	-	-	-
<i>M. simiae</i>	human	+	-	-	-
<i>M. abscessus</i>	human	+	-	-	-
<i>M. lentiflavum</i>	bovine	+	-	-	-
<i>M. porcinum</i>	fish	+	-	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	bovine	+	-	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	bovine	+	-	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	bovine	+	-	-	-
<i>M. terrae</i>	bovine	+	-	-	ND
<i>M. terrae</i>	bovine	+	-	-	ND
<i>M. Spp</i>	wild boar	+	-	-	-
<i>M. Spp</i>	wild boar	+	-	-	-
<i>M. Spp</i>	wild boar	+	-	-	-
<i>M. Spp</i>	bovine	+	-	-	-
<i>M. termoresistibile</i>	bovine	+	-	-	-
<i>M. chitae</i>	bovine	+	-	-	-
<i>M. gadium</i>	human	+	-	-	-
<i>M. gadium</i>	human	+	-	-	-

*DR: probe: 39° DR (SP-F670A, 40° DR (SP-F680A), 41° DR (SP-F690A), 42° DR (SP-F700A) 43° DR (SP-F710A).

**other probe: 1° DR (SP-F310A), AVI, INT, MAR, SCR, FOR, XEN, SME.

N.D.: not determined.

intracellulare was positive with the probes MYC and INT. *M. marinum* was positive for the probes MYC and MAR. The two human *M. fortuitum* strains were positive for MYC and FOR; on the other hand the *M. fortuitum* isolate from fish was positive with the MYC probe only; *M. scrofulaceum* strains were positive with the probes MYC and SCR; *M. xenopi* strains were positive with the probes MYC and XEN. Finally *M. smegmatis* strains were positive with the probes MYC and SME. The others NTM used as negative controls, such as *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. chelonae*, *M. malmoense*, *M. flavescens*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. abscessus*, *M. lentiflavum*, *M. porcinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. termoresistibile*, *M. chitae* and *M. gadium* were positive with the MYC probe only.

DISCUSSION

The results showed that the chip is suitable to identify *Mycobacterium* isolates of both human and animal origin.

The SNPs-based chip recently developed⁶ needed addition SNPs to increase the discriminatory power for the East African-Indian (EAI) genotype and to distinguish *M. canettii*, *M. caprae* and *M. pinnipedi* from the other MTBC members⁶.

The device here developed is able to discriminate the MTBC from MAC and NTM. Within MTBC it is possible differentiate, in a single step, *M. tuberculosis* from *M. bovis* / *M. caprae* / *M. microti* group based on the positivity of the DR spacers (see Results) with the exception of the two resistant *M.*

tuberculosis strains that were both negative for the 1°DR spacer. Within MAC it is possible to differentiate *M. avium* subsp. *paratuberculosis* / *M. avium* subsp. *avium* from *M. avium* subsp. *intracellulare* and within NTM it is possible to distinguish *M. fortuitum*, *M. marinum*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum* and *M. xenopi*.

The biochip developed is rapid, sensitive and specific. It presents a diagnostic sensitivity of 100% for the *Mycobacterium* genus. The diagnostic sensitivity at species level is about 96% (67% for *M. fortuitum* and 100% for all other species). Therefore, the chip is a quick (3.5 h from PCR to results) and reliable method for the simultaneous characterization of mycobacterium isolates.

In human field, the correct species identification is very important because NTM have a different clinical relevance and different drug susceptibility. In veterinary field the NTM represent a large part of the mycobacteria population that have been under diagnosed and therefore underestimated despite their significant impact on animal health. They cause infection, lost of productivity and interfere with the diagnosis and control bTB. In addition, the accurate identification of NTM is also important for epidemiological studies. Sometimes NTM can co-exist with bTB in the same herd or in the same animals and lead to misdiagnosis⁹. For this reason it is useful to have a sensitive and specific method capable of discriminating tuberculosis mycobacteria from NTM. The device is not able to discriminate *M. bovis* from *M. caprae* and *M. microti* within the MTBC, but the chip is open to continuous development by inserting specific probes of other mycobacteria species according to the diagnostic requirements. We synthesized the probes with a spacer to allow the binding to the biochip support and the enhancement of signal intensity¹⁰. Results were read by a reader without “personal interpretations”. We included in the study many species and some subspecies of mycobacteria previously typed by biochemical and/or molecular techniques in order to evaluate the specificity of the device. No signal was detected by using DNA from *M. malmoense*, *M. abscessus*, *M. szulgai*, *M. simiae*, *M. lentiflavum*, *M. porcinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. termoresistibile*, *M. chitae* *M. gadium*. This study shows that there is not cross-hybridization between the samples and the probes and therefore the result is unambiguous. Furthermore it is possible to process a large number of samples in a single step in 3.5 hours. For these characteristics the chip can be adopted in those laboratories involved in human and animal public health.

CONCLUSION

The device is able to characterize mycobacterium isolates in a single step by performing a Multiplex PCR and then hybridizing the PCR products on a chip. It is easy to use and requires no special equipment. The device can be used by laboratories with basic knowledge of molecular biology. In conclusion the chip is a quick (3.5 h from PCR to results) and reliable method for the simultaneous characterization of mycobacterium isolates.

The study was supported by the Italian Ministry of Health grant IZSUM 11/07 RC (Studio, sviluppo e validazione di nuove tecniche diagnostiche biomolecolari (chip) per la sanità pubblica).

References

1. Van Ingen J. (2013). Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* 34, 103-109.
2. Jagielski T, van Ingen J, Rastogi N, Dziadek J, Mazur PK, Bielecki J. (2014). Current methods in the molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Bio Med Research International*; Article ID 645802, 21 pages, doi:10.1155/2014/645802
3. Falkinham III J.O. (2009). Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in human environment. *J. Appl. Microbiol.* 107(2) 356-367.
4. Di Marco V, Mazzone P, Capucchio M.T., Boniotti M.B., Aronica V., Russo M., Fiasconaro M., Cifani M., Corneli S., Biasibetti E., Biagetti M., Pacciarini M.L., Cagiola M., Pasquali P., Marianelli C. (2012). Epidemiological significance of the domestic black pig (*Sus scrofa*) in maintenance of bovine tuberculosis in Sicily. *J. C. M.* 1209-1218.
5. Aranaz A., Cousins D., Mateos A., Dominguez L. (2003). Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 1785-1789.
6. Srilohasin P, Chaiprasert A, Tokunaga K., Nao N., Prammananan T. (2014). Novel DNA chip based on modified digi tag2 assay for high-throughput species identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates *J.C.M.* 52(6), 1962-1968.
7. Xiong L., Kong F., Yang Y., Cheng J., Gilbert L. (2006). Use of PCR and reverse line blot hybridization macroarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 *Mycobacterium* species. *J.C.M.* 44(10), 3544-3550.
8. Kamerbeek J, Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Sooligen D., Kuijper S., Bunschoten A., Molhuizen H., Shaw R., Goyal M., van Embden J. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J.C.M.* 35(4), 907-914.
9. Biet F, Boschirolu M.L. (2014). Non - tuberculous Mycobacterial infections of veterinary relevance. *Res. Vet. Sci.*. Doi: 10.1016/j.rvsc.2014.08.007
10. Peplies J., Glöckner F.O. Amannl, R. (2003). Optimization Strategies for DNA Microarray-Based Detection of Bacteria with 16S rRNA-Targeting Oligonucleotide Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (3) 1397-1407.

PUBBLICAZIONE ARTICOLI LARGE ANIMAL REVIEW

I medici veterinari interessati alla pubblicazione di articoli scientifici sulla rivista “LARGE ANIMAL REVIEW” devono seguire le indicazioni contenute nel file **Istruzioni per gli autori** consultabili al sito <http://www.sivarnet.it>

INFORMAZIONI:

Segreteria di Redazione - redazione@rivista.sivarnet.it

MASTOUT®

250 mg

cefalonio

pomata intramammaria
per bovine in asciutta

...buttafuori
la... *mastite*



TEMPI DI ATTESA

Carne e visceri: 2 giorni.
Latte: 168 ore dopo il parto (7 giorni - 14 mungiture)
con un periodo minimo di 51 giorni tra il trattamento e il parto

CONFEZIONAMENTO

Confezione da 20 e 60 siringhe + salviette detergenti

FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria
40064 Ozzano Emilia (BO)
Tel. 051 6512711 - Fax 051 6512714
www.fatro.it - e-mail: info@fatro.it



la salute animale per la salute dell'uomo

Elanco™

Imrestor™

Anche i migliori allevatori
di bovine da latte hanno
bisogno di un valido aiuto per
proteggere le loro mandrie



Imrestor™ (*pegbovigrastim iniettabile*) è una citochina immunomodulante per vacche da latte e manze nel periparto. Durante il periodo critico intorno al parto, quando il sistema immunitario della vacca da latte è compromesso¹, **Imrestor™** aiuta a ripristinare la funzionalità e aumentare il numero dei neutrofili circolanti, prima linea di difesa contro i microrganismi, riducendo significativamente l'incidenza delle mastiti cliniche post parto.² Un valido aiuto per proteggere le mandrie di vacche da latte.

Per proteggere l'intera mandria con **Imrestor™**, nell'ambito di un programma integrato di gestione sanitaria, contatta il tuo informatore Elanco.

Bibliografia:

1. Kimura K, et al. J Dairy Sci. 1999;82:2385-2392.
2. Elanco Animal Health, dati in archivio. Rapporto finale sullo studio, studio P2G-FR130003/2013-01-03-02-062

Elanco, Imrestor™ e la barra diagonale sono marchi di proprietà registrati o utilizzati dietro licenza di Eli Lilly and Company, delle sue controllate o affiliate.

Imrestor™ è un marchio registrato del marchio di Elanco per il pegbovigrastim. © 2016 Eli Lilly and Company, le sue controllate o affiliate. ITDRYRS00062

Elanco Italia S.p.A. - Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto F.no (FI)

Tel. 055 4257.031 - Fax 055 4257.068 - www.elanco.it - e-mail: Elanco_FA.Italia@elanco.com

Elanco

A review on the use of vermiculite-based feed additives as possible control strategy for the reduction of environmental pollution from swine farming



R. CONSIGLIERE¹, D. MELONI²

¹ Professional Veterinarian, Professional Register of the Nuoro Province, Via Gramsci 59, 08100 Nuoro, Italy

² Department of Veterinary Medicine, University of Sassari, Via Vienna 2, 07100, Sassari, Italy

SUMMARY

Respiratory diseases are of great economic concern in intensive pig farming. The pigs are housed indoor for almost the whole production cycle and are thus exposed continuously to gaseous compounds and low molecular weight arising from slurry and responsible for environmental pollution as well as deterioration of human and animal welfare condition. The presence of these pollutants causes the chronic exposure of animals and workforce to aerial pollutants and has a general impact on the aquatic, terrestrial and atmospheric ecosystems. They are classified among the air pollutants due to their hazardous properties as many of such compounds can contribute to stratospheric ozone depletion, global warming, and ozone formation in the troposphere. Many of the compounds identified in pig slurry have low olfactory thresholds and their concentration in livestock buildings have been monitored in many countries. The increasing ecological awareness and the expansion of residential plots towards farming areas has created conflict of interest as residents are becoming less inclined to tolerate foul odours of the farms pervade the neighbourhoods. The greatest challenge in managing the pig waste is the disposal of large quantities of slurry and manure that at the moment is most commonly disposed of by application to land as fertiliser. The effective reduction of the emission of gaseous compounds and low molecular weight arising from slurry is an important goal for the whole pig industry and several techniques have been trialled, including the use of vermiculite-based feed additives in fattening pigs. The inclusion in pig diet of clay minerals for reduction of pollution from pig slurry have some positive effects on production performance, carcass yield and composition. Moreover, silicates can reduce manure pollutant without detrimental effect on production, carcass and meat quality. In the present review, the use of vermiculite-based feed additives as possible control strategy for reducing environmental pollution from pig slurry will be discussed.

KEY WORDS

Vermiculite, ammonia, nitrate, pig growth, environment.

INTRODUCTION

In intensive pig farming, the pigs are housed indoor for almost the whole production cycle and are thus exposed continuously to gaseous and particulate pollutants¹. Dust and emission of gaseous compounds of low molecular weight arising from slurry are the two main issues responsible for environmental pollution as well as deterioration of human and animal welfare condition. Their presence in the slurry and subsequently in the atmosphere raises two concerns: *a*) the chronic exposure of animals and workforce to aerial pollutants², *b*) the general impact on the aquatic, terrestrial and atmospheric ecosystems³. Many of the compounds identified in pig slurry have low olfactory thresholds⁴. The increasing ecological awareness and the expansion of residential plots towards farming areas has created conflict of interest as residents are becoming less inclined to tolerate foul odours of the farms pervade the neighbourhoods⁵. The concentrations of the main pollutants in livestock buildings have been monitored in many countries and is now an important goal for

the whole pig industry to reduce effectively the emission of such compounds. Several techniques for abatement and control have been trialled, however, the production and emission of polluting gasses and dust are still difficult to keep under control and will be discussed in the present review.

RELATIONSHIPS BETWEEN ATMOSPHERIC POLLUTION ON PIG FARM AND INCIDENCE OF RESPIRATORY PATHOLOGIES

Respiratory diseases are of great concern in pig farming⁶. Enzootic pneumonia is one of the major respiratory diseases followed by atrophic rhinitis and pleuropneumonia. The exposure to ammonia (NH) can play an important etiological role in the development of a chronic respiratory syndrome in pig farmers⁷. Pigs can be affected by the exposure to air pollutant in a similar way to the people, more intensively but for much shorter periods, typically only for a few months for 24 hours a day. The effects of poor air quality on pig production and the constant exposure to aerial pollutants have been linked to the aetiology of multi-factorial respiratory diseases in livestock⁸. Dust seems to play an important role, so as logical consequence high concentration of dust and gases may re-

Autore per la corrispondenza:
Domenico Meloni (dmeloni@uniss.it).

duce productivity of pigs⁹. Urbain¹⁰ reported bronchial inflammation in pigs artificially exposed to dust from feed at concentrations from 1 to 15 mg/m³, however the same treatment had no effect on the state of the nasal mucosae. In experimentally induced infection by toxigenic *Pasteurella multocida* type D, Hamilton et al.¹¹ describe the direct and indirect mechanisms by which ammonia and dust can play role in the pathogenesis of the disease. Similarly, Andreasen et al.¹² have shown that continuous exposure to either 50 or 100 ppm ammonia enhanced the colonisation of the nasal turbinate by toxigenic *Pasteurella multocida*. Moreover, in induced infection of *Pasteurella multocida* combined with *Mycoplasma hyopneumoniae*, the exposure to 50 ppm ammonia is unlikely to predispose growing pigs to pulmonary infection and no significant effect was found on pneumonia, conchal atrophy or liveweight gain¹³. Dust concentrations equal or higher than 1.5 mg/m³ adversely affect the production performance¹⁴. Jones et al.¹⁵ found that weaned pigs have a delayed aversion to ammonia at concentrations of 10 ppm and above. Some farms and livestock buildings more than others have levels of aerial pollutants that may be associated with porcine respiratory disease¹⁵. In a large scale study by Done et al.¹⁶ weaned pigs were housed in a purpose built building equipped with artificial ventilation for five weeks and exposed to ammonia at concentration of 0.6 to 37 ppm and to inhalable dust at concentration of 9.9 to 12 mg/m³. The exposure was not associated with an increase in the incidence of respiratory or other diseases. On commercial units for pig weaning, the quantities of dust and ammonia normally found in buildings are unlikely to be associated with respiratory diseases as long as good husbandry practices are implemented. All stocking density must be kept at the minimum level possible as crowding and low air volume per pig have been identified among the risk factors for respiratory diseases⁶. Extensively housed pigs had reduced prevalence of enzootic pneumonia lesions if pen space and air volume were kept at above-average standards¹⁷. The findings reported above should be sufficient to justify the objective of reduction of gaseous emissions and dust in the atmosphere to safeguard the welfare of pigs. In this context, the correct management of by product waste have a key role in keeping acceptable environmental condition.

AERIAL POLLUTION OF AMMONIA AND NITRIC OXIDE FROM PIG SLURRY

Inorganic and organic volatile compounds can be released from pig manure and slurry¹⁸. They can contribute to stratospheric ozone depletion, global warming, and ozone formation in the troposphere¹⁹. Prolonged exposure of human beings to some of these compounds has been associated to various health problems as eye and throat irritation, damage to liver and central nervous system and carcinogenic effects²⁰. In a study on swine slurry lagoons O'Neill et al.²¹ have identified 160 odorous compounds of different origin. Among the different components of pig slurry ammonia is one the major contributors to environmental pollution²² and can account for the 40% of total nitrogen in raw slurry²³. Urea, which represents more than 95% of the total nitrogen in pig urine²⁴, is converted into ammonia and carbon dioxide by the enzyme urease²⁵. During storage, ammonia is produced in variable quantities

depending upon temperature and aeration of the slurry²⁶. As stirring and aeration of slurry is a common practice on farm, it is important to note that during the process not only is ammonia released but also nitrous oxide (N₂O) gas, which can account for up to 13% of the total slurry nitrogen content²⁷. Nitrous oxide gas is one of the causes of stratospheric ozone depletion, global warming and climate change²⁸. The global warming potential of N₂O is about 250 times higher than carbon dioxide and agriculture is estimated to contribute from 65 to 80% of the total nitrous oxide produced by human activity which amount to around 2 Tg N₂O-N/yr²⁹. Nitrous oxide represents up to 30% of the total nitrogen content of the raw slurry³⁰ and is released in the atmosphere mainly during storage. Nitrification and denitrification are the main source of nitrous oxide from slurry. N₂O is generated during nitrification from an intermediate ahead of nitrite³¹ and the higher the ammonium concentration in the slurry, the more nitrous oxide is released into the atmosphere. The production of N₂O is considerably increased if nitrification is incomplete as result of short residence times, nitrite accumulation and low oxygen concentrations³². Goreau et al.³³ investigated the bacterial species involved in the process and found that *Nitrosomonas* is responsible for N₂O emission rather than *Nitrobacter*. During denitrification more N₂O is produced if the process is incomplete. Variations in oxygen concentration determine different levels of inhibition of the enzymes, as the N₂O reductase is more susceptible to oxygen than nitrate and nitrite reductase. The reduction of N₂O is a slower process under low oxygen pressure than the reduction of nitrate and nitrite³⁴. In conditions of high aeration the inhibition of the denitrification path due to increased oxygen concentration leads to a reduced efficiency of the nitrous oxide reductase enzyme with the consequence of an incomplete denitrification and N₂O emissions. However, nitrification and denitrification can take place simultaneously at low level of aeration with N₂O emissions reported to be lower than emissions observed during continuous aeration³⁵. In mixed aerobic and anaerobic system denitrification intermediates such as NO₂, NO, N₂O accumulate temporarily³⁶ and sufficiently long anoxic period are required to allow enzyme activation. In intensively farmed areas of Europe the nitrogen load exceeds the farm nitrogen requirements and thus the disposal of slurry can potentially cause hazardous nitrate pollution of ground water³⁷. Therefore, the safe and efficient disposal of slurry is a subject of common concern in most areas of specialised livestock production³⁸.

STRATEGIES TO CONTROL AERIAL POLLUTION FROM PIG SLURRY

The legislation is tightening pollution prevention^{39,40,41} and creating a need for the industry to produce cost effective and innovative methods to reduce the pollution sourced from pig slurry. The issues have to be addressed by setting out objective methods of measurement for polluting emissions and establishing the efficacy of mitigation techniques^{5,29}. Many research groups investigated ways to reduce odorous and polluting compounds by modifying the composition of urine and faeces with the aim of reducing the urea and total nitrogen excretion. Some researchers focused their attention on lowering the Crude Protein (CP) content in the diet and thus the nitrogen intake:

Method	Result	Reference
Multiphase feeding at reduction of 1% in dietary CP content in comparison to a single control diet of 16.7% CP	Reduction of N excretion by 50%	(42)
Multiphase weekly mixing of feeds at 17% and 13% CP	Reduction of N in faeces by 10-20%	(43)
Use of different rations for pregnancy (14% CP) and lactation (12% CP)	Reduction excretion of nitrogen by 20%	(44, 45, 46)
Reduction of dietary CP from 16.6% to 13%	No negative effect on growth rate, feed intake and carcass characteristics	(47, 48)

Pigs fed with low CP supplemented with amino acid had slower growth than those fed the control diet⁴⁷. In addition, pigs fed with similar diets tend to increase body fat compared with pigs receiving higher levels of dietary CP⁴⁶. Several papers describe the effect of dietary protein on ammonia emission:

Method	Result	Reference
Decrease of CP content in the diet	Decrease of urinary nitrogen excretion and total nitrogen content in the slurry	(48, 52)
Decrease of pH in the slurry	Reduction of ammonia volatilisation	(49, 50, 51)

Other authors tried to increase the dietary crude fibre content to modify nitrogen excretion⁵³. The high energy supply of fermentable organic matter increases energy available for microflora and increases secretion of urea from the blood into the large intestine. As urea is broken down to ammonia by bacterial urease, microbial growth and protein synthesis are enhanced, as result less ammonia is reabsorbed from the colon, the microbial protein is finally excreted in the faeces thus nitrogen excretion shifts from urine to faeces^{54,55}. The pH of urine influences ammonia volatilisation modification of the dietary electrolyte balance⁵⁶. The addition of non-starch polysaccharides in the diet to promote Volatile Fatty Acid (VFA) formation, influence pH and thus ammonia volatilisation. Increasing the VFA formation in the faeces and slurry lead to a higher nitrogen excretion through the faeces in the form of bacterial protein and a lower excretion through the urine in the form of urea^{52,57}. Similarly, feeding clinoptilolite to growing pigs reduced the absorption and thus also the conversion of ammonium to urea, which resulted in reduced excretion of nitrogen with urine⁵⁸. Other authors found that the addition of clinoptilolite resulted in a lower energy content of the diet and a reduction in daily gain whilst feed intake and feed conversion ratio were not affected:

Method	Result	Reference
Combination of clinoptilolite addition and diet at 16.5% CP in piglet	Increasing of piglet weight at birth and weight gain during lactation	(59)
Combination of clinoptilolite addition and diet at 16% CP in fattening pigs	No effect on body weight gain to feed intake ratio	(60)
Use of clinoptilolite and diet at 15.2% CP levels	Improvement of daily body weight gain	(61)
Use of clinoptilolite and diet at 14.6% CP levels	Increasing of body weight gain and improvement of diarrhea condition	(62)

The most common method used to reduce the pollution hazard from slurry is the microbial aerobic and anaerobic degradation during storage. To exploit the microbial nitrification and denitrification several systems have been conceived⁶³. The transformation of nitrogen in the slurry is influenced mainly by the level of aeration, the carbon content and residence time of the slurry in the reactor. Typically, nitrification takes place at dissolved oxygen concentration of above 1-2% of saturation and with a residence time of more than three days⁶⁴ whereas denitrification typically occurs when the dissolved oxygen concentration is below 10-15% of saturation⁶⁵.

The aim of the aerobic-anaerobic system is to keep the dissolved oxygen concentration in the slurry between 1 and 10% of saturation. Preferably make use of raw slurry of high carbon content to reach full oxidation of ammonium (95%) and removal of 66% of the total nitrogen⁶⁶. During continuous aerobic treatment, an increased length of the anaerobic storage can prevent N₂O emissions and promote full denitrification with production of nitrogen gas⁶⁶. However, if aeration starts before denitrification is completed, the N₂O previously accumulated in the liquid is released in the atmosphere. Any improvement in the efficiency of the aerobic and anaerobic microbial and enzymatic activity should increase the efficiency of nitrogen removal from slurry. Up to now many of the solutions above have been used to achieve compliance with more stringent health, welfare and environmental regulations⁶⁷. However, the cost of abatement can be prohibitive thus different sorts additives have appeared on the market to reduce the odorous emissions from manure and slurry.

These products mixed with the manure should alter the chemical, physical and biological processes responsible for the polluting emissions. It is possible to include some of the additives for waste treatment in the animal feed instead of adding them in the slurry or manure storage system⁶⁸. Some attempts to reduce ammonium in pig intestine have been made by administering antibiotics⁶¹. This resulted in a reduction of ammonia produced in the hind-guts and increased the production performances, however routine administration of antibiotics for enhancing growth is not a reasonable path to follow as it increases considerably the risk of developing bacterial strains resistant to antibiotics.

STRUCTURE AND CHEMICAL PROPERTIES OF CLAY MINERALS

Vermiculites and Zeolites are the two categories of silicates most commonly used for waste processing and in the animal feed. Zeolites are part of tectosilicates group, at the present 39 natural zeolites have been identified whilst around 100 zeolites are synthetic⁶⁹. The name is of Greek origin meaning "boiling stones" because of intumescences occurring when the mineral

is heated and the rapid evaporation of water increases its volume. A similar property of Vermiculite is known as “exfoliation”: under the pressure of the steam the silicate layers are forced apart from one another, easily take up and lose water molecules. An increase of the vermiculite flake from 20 to 30 times the original thickness is confirmed in SEM observations⁷⁰ showing the consequences of intense heating: at temperatures of 300-400 °C the vermiculite flakes turn into elongate structures resembling an earthworm, this is the reason and the origin of the name vermiculite, from the Latin *vermicularis* worm-like shape. The intumescence and exfoliation of vermiculite is caused by the dimensional structure of the basic units in common with other silicate minerals shaped by several frameworks of tetrahedral fashion linked by all their corners. Vermiculite is a secondary form of biotite, a mineral of mica group found in igneous rock formed by the hydration of basaltic minerals classified among the group of phyllosilicate or sheet silicate⁷¹. It appears as a platy mineral with the appearance of golden/brown flakes, which are classified into five grades according to the particle sizes: *i.e.* the coarse grade consists of particles ranging from 8 mm to 2.8 mm, while the finest grade consists of particles ranging from 0.710 mm to 0.250 mm. This classification is important for some technological applications where particle size makes a significant difference. The exfoliation property is due to a lattice made of several silicate sheets having a sandwich structure made of the tetrahedral sub-units of silica and aluminium (the tetrahedral layers) joined with a layer made of oxygen, magnesium, and hydroxyl molecules (the octahedral layer). The layers are arranged as follows: the octahedral sheet is positioned between two tetrahedral layers, the three resulting sheets are further interspersed with an ion exchangeable layer, of variable thickness depending on the interlayer cation present, which is normally magnesium, and the arrangement of the water molecules associated with it. Usually one or two sheets of water molecules are associated with the cations and are interspersed between the silicate layers, so the structure of vermiculite is fundamentally similar to talc by interposition of water molecules in a definite sheet of 4.98 Å thickness. A common property of vermiculite is the cation exchange possible as the molecular structure described above absorbs and retains certain anions and cations in aqueous solution in exchangeable state. The cations are loosely bonded to the tetrahedral framework and can be exchanged by washing with a strong solution of another ion. The exchangeability depends on many factors such as nature of the ion, temperature and pH. At the origin of this phenomenon are two mechanisms: one is the presence of broken bonds or hydroxyl groups available for the substitution of cations at the edges and corners of the silicate layers⁷². As the particle size and degree of crystallinity decrease, the number of broken bonds increases and so does the exchange capacity. The other cause of exchange capacity is the substitution of cations within the lattice structure in both the tetrahedral and octahedral sheets known as “isomorphous substitution”. If the substitution occurs in the tetrahedral sheet usually the trivalent aluminium cation replaces tetravalent silicon. In the case of substitution in the octahedral sheet, magnesium or another ion of lower valence can replace trivalent aluminium. The substitutions can unbalance the layer structure of the minerals so are often balanced by filling more than two-thirds of the possible octahedral positions or by other substitution as OH⁺ for O, although are more frequently balanced by other adsorbed cations. The bond

strength of the cations to the layer is related to the distance of the silicate sheet from the ion-exchangeable layer: the charges resulting from substitutions in the octahedral sheet would have to act through a greater distance than the charges resulting from substitutions in the tetrahedral sheet, so the cations held because of the latter substitution would be bonded more strongly than those held by the octahedral sheet. Therefore, most of the exchangeable cations are accessible on a plane surface. To maximise the cation exchange, the particle size is not so critical as is the expansion of the silicate sheets since the rate of cation exchange usually increases proportionally to the exposed surface area. The exchangeability of a cation in the interlayer space depends on the size of the entering cation and on the strength of the bond between the layers. Vermiculite has a cation exchange capacity of 120-150 meq/100 g and is able to substitute Mg²⁺ and Fe²⁺ for Al³⁺ in the octahedral positions and Al³⁺ for Si⁴⁺ in the tetrahedral positions⁷².

APPLICATIONS OF CLAY MINERALS FOR THE REDUCTION OF AERIAL POLLUTION FROM SWINE FARMING

It is well established that clay minerals such as zeolites and vermiculite can bind water and ammonia efficiently due to their ion exchange properties and thus improve the ammonia/ammonium ion equilibrium in water solutions. They can modulate microbial activity hosting the bacteria within the porous structure. These are the reasons of the large number of applications of clay minerals in particular for the extensive use in waste treatment technologies. Silicate minerals can enhance enzymatic and microbial transformation of many substances including proteins, carbohydrates, phenolic compounds, sulphur and ammonium⁷³. Clays are very abundant on earth thus are low cost materials virtually non-toxic that can be fed to animals. Trials in laboratory conditions on composting of pig and cattle fresh slurry with the addition of clinoptilolite and phillipsite-rich tuffs showed a significant uptake of ammonia and consequently reduced emission in the atmosphere^{74,75}. Several studies have included clays for waste treatment in the animal feed instead of adding them in the slurry or manure storage system:

Method	Result	Reference
Zeolitic tuff into the diet of finishing pigs at 5% rate	Significant reduction of odours and reduction of the aerial ammonia concentration by 21-28.5%	(76, 77)
Clinoptilolite tuff at the supplementation rate of 2% in growing and finishing pig diets	Reduction in aerial ammonia level of 27.1%	(78)

Poulsen et al.⁵⁸ showed that clays are able to reduce aerial ammonia shifting the nitrogen excretion from urine to faeces and consequently reducing urea excretion. However, results of the several experiments on the effects of clays on pig growth performance are not completely clear as the variation in dietary composition might alter the effect of clay minerals⁷⁹. Vermiculite has been used in large quantities to saturate pig slurry and thus bind ammonia to obtain a slow release

of nitrogen for fertilisation⁸⁰, and as inert support and aid of microbial fermentation for composting of a wide range of materials including plastic⁸¹. The addition of the clay at 10% rate over the total litter volume was able to remove volatile organic compounds with an efficiency of 61.53%⁸². Vermiculite added to cow manure has been used successfully⁸³ to enhance biogas production and reduce the time necessary for starting gas production. Minerals support the adhesion, and subsequently, the growth of bacteria and are a source of nutrients used by bacteria for a better growth⁸⁴. This is supported by an increased initial production of gas in bio-gas plant fermenting slurry mixed with vermiculite⁸³. Finally, it is interesting to note that vermiculite has been used in diet as adsorbent of linseed oil⁸⁴ to “protect” fatty acids from rumen bio-hydrogenation, achieving a partial protection of the fatty acids. Fatty acids are involved in many “technological” features of meat quality as fat colour, flavour development, oxidation and thus shelf life due to the different melting point that influences the hardness or softness of carcass fats (subcutaneous and intermuscular) and of the marbling fat (intramuscular)⁸⁵. Therefore, any interaction of a new feed additive on fatty metabolism has to be considered carefully.

CONCLUSION

The inclusion in pig diet of clay minerals for reduction of pollution from pig slurry and the effects on production performance, carcass yield and composition have been studied in several papers^{58,59,60,62,86,87,88}. These papers show that the feed inclusion of clay minerals had some positive effects on body weight gain in combination with diet with low CP diet and no negative effects on carcass quality of growing and fattening pigs and sensory evaluation of meat and other edible offal as liver, kidneys and heart^{62,89,90}. In addition to this, Vrzgula and Bartko⁹¹ reported no significant differences in metabolic functions. Therefore, clay minerals can reduce inorganic and organic volatile compound from slurry without detrimental effect on production, carcass and meat quantity.

References

- Wathes, C.M. (1998). Environmental control in pig housing. Proceedings of the 15th International Pig Veterinary Society Congress. Birmingham, UK, July 5 to 9. S. Done, J. Thomson, M. Varley. (Eds) Vol 1. Nottingham, Nottingham University Press. 257-265.
- Donham, K., Reynolds, S., Whitten, P., Merchant, J., Burmeister, L. and Penderford, W. (1995). Respiratory dysfunction in swine production facility workers: dose response relationships of environmental exposures and pulmonary function. *American J. Ind. Med.* 27, 405-418.
- Apsimon, H.M., and Kruse-Plass, M. (1990). The role of ammonia as an atmospheric pollutant. In: Nielsen, V. C., Voorburg, J. H. and L'Hermite, P. (Eds.), *Odour and Ammonia Emissions from Livestock Farming*. Elsevier Applied Science, London. p 17.
- Devos, M., Patte, F., Rouault, J., Laffort, P., Van Gemert, L.J. (1990). Standardized human olfactory thresholds. Information Press, Oxon, UK.
- Valli, L. (2001). Le emissioni degli odori negli allevamenti zootecnici. *Informatore agrario*, 46, 35-40.
- Pi Joan, C., (1986). Respiratory system. In: A.D. Leman, B. Straw, R.D. Glock, W.L. Mengeling, R.H.C. Penny and E. Scholl (Editors), *Diseases of Swine*, 6th edn. Iowa State University Press, Ames, pp. 52-161.
- Preller, L., Heederik, D., Boleij, J.S., Vogelzang, P.F., Tielen, M.J. (1995). Lung function and chronic respiratory symptoms of pig farmers: focus on exposure to endotoxins and ammonia and use of disinfectants. *Occ. Env. Med.* 52, 654-660.
- De Boers, S. and Morrison, W.D. (1988). The effects of the quality of the environment in livestock buildings on the productivity of swine and the safety of humans. Monograph. Guelph, Department of Agriculture, University of Guelph.
- Drummond, J.G., Curtis, S.E., Simon, J. and Norton, H.W. (1980). Effects of aerial ammonia on growth and health of young pigs. *J. An. Sci.* 50, 1085-1091.
- Urban, B., Mast, J., Beerens, D., N'Guyen, T.Q., Goddeeris, B., Ansary, M. and Gustin, P. (1999). Effects of inhalation of dust and endotoxin on respiratory tracts of pigs. *Am. J. Vet. Res.* 60, 1055-1060.
- Hamilton, T.C.D., Roe, J.M., Hayes, C.M., Jones, P., Pearson, G.R. and Webster, A.J.F. (1999). Contributory and exacerbating roles of gaseous ammonia and organic dust in the aetiology of atrophic rhinitis. *Clin. Diagnostic Lab. Imm.*, 6, 199-203.
- Andreasen, M., Baekbo, P. and Nielsen, J.P. (1999). Effect of aerial ammonia on porcine infection of the respiratory tract with toxigenic *Pasteurella multocida*. *Acta Vet. Scand.* 40, 197-203.
- Andreasen, M., Baekbo, P. and Nielsen, J.P. (2000). Lack of effect of aerial ammonia on atrophic rhinitis and pneumonia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* and toxigenic *Pasteurella multocida*. *Journal of Veterinary Medicine, Series B - Inf. Dis. Vet. Public Health* 47, 161-171.
- Wathes, C.M., Demmers, T.G.M., Teer, N., White, R.P., Taylor, L.L., Bland, V., Jones, P., Armstrong G.D., Gresham, A.C.J., Hartung, J., Chennells, D.J. and Done, S.H. (2004). Production responses of weaned pigs after chronic exposure to airborne dust and ammonia. *Anim. Sci.* 78, 87-97.
- Jones, J.B., Burgess, L.R., Webster, A.J.F. and Wathes, C.M. (1996). Behavioural responses of pigs to atmospheric ammonia in a chronic choice test. *Anim. Sci.* 63 (3), 437-445.
- Done, S.H., Chennells, D.J., Gresham, A.C.J., Williamson, S., Hunt, B., Taylor, L.L., Bland, V., Jones, P., Armstrong, D., White, R.P., Demmers, T.G.M., Teer, N., Wathes, C.M. (2005). Clinical and pathological responses of pigs to atmospheric ammonia and dust. *Vet. Rec.* 157, 71-80.
- Ross, R.F., (1986). Mycoplasmal diseases. In: A.D. Leman, B. Straw, R.D. Glock, W.L. Mengeling, R.H.C. Penny and E. Scholl (Eds.), *Diseases of Swine*, 6th edn. Iowa State University Press, Ames, pp. 469-483.
- Hartung, J., Phillips, V.R. (1994). Control of gaseous emissions from livestock buildings and manure stores. *J. Agri. Eng. Res.* 57 (3), 173-189.
- Komilis, D.P., Ham, R.K., Park, J.K. (2004). Emission of volatile organic compounds during composting of municipal solid wastes. *Water Res.* 38, 1707-1714.
- Das, D., Gaur, V., Verma, N. (2004). Removal of volatile organic compound by activated carbon filter. *Carbon* 42, 2949-2962.
- O'Neill, D.H., Phillips, V.R.A. (1992). Review of the control of odour nuisance from livestock buildings: Part 3: Properties of the odorous substances which have been identified in livestock wastes or in the air around them. *J. Agri. Eng. Res.*, 53, 23-50.
- Zahn, J.A., Hatfield, J.L., Do, Y.S., Di Spirito, A.A., Laird, D.A., Pfeiffer, R.L. (1997). Characterization of volatile organic emissions and wastes from a swine production facility. *J. of Environ. Qual.* 26, 1687-1696.
- Evans, M.R., Smith, M.P.W., Deans, E.A., Svoboda, I.F., Thacker, F.E. (1986b). Nitrogen and aerobic treatment of slurry. *Agri. Wastes*, 15, 205-213.
- Canh, T.T., Versteegen, M.W.A., Aarnink, A.J.A., and Schrama, J.W. (1997). Influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs. *J. Anim. Sci.* 75, 700-706.
- Stevens, R.J., Laughlin, R. J., and Frost, J.P. (1989). Effect of acidification with sulphuric acid on the volatilization of ammonia from cow and pig slurry. *J. Agri. Sci.* 113, 389.
- Freney, J.R., Simson, J.R. and Denmead, O.T. (1983). Volatilization of ammonia. *Dev. Plant Soil Sci.* 9, 1.
- Willers, H.C., Derikx, P.J.L., Ten Have P.J.W., Vijn, T.K. (1996). Emission of ammonia and nitrous oxide from aerobic treatment of veal calf slurry. *J. Agri. Eng. Res.*, 43, 291-311.
- Delany, A.C., Haagensen, P., Walters, S., Wartburg, A.F., Crutzen, P.J. (1985). Photo-chemically produced ozone in the emission from large-scale tropical vegetation fires. *J. Geophysical res.* 1, 2425-2429.
- Houghton, J.T., G.J. Jenkins, and J.J. Ephraums (eds.). (1990). *Climate Change: The IPCC Scientific Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge, 365 pp.
- Beline, F., Martinez, J., Chadwick, D., Guizou, F., Coste, C.-M., (1999). Factors affecting nitrogen transformations and related nitrous oxide emissions from aerobically treated piggery slurry. *J. Agri. Eng. Res.* 73, 235-243.
- Yoshida, T., Alexander, M. (1970). Nitrous oxide formation by *Nitrosomonas europaea* and heterotrophic microorganisms. *Soil Science Society of America Proceedings*, 34, 880-882.
- Beline, F., Martinez, J., Marol, C., Guiraud, G., (2001). Application of the 15 N technique to determine the contributions of nitrification and denitrification to the flux of nitrous oxide from aerated pig slurry. *Water Res.*, 35, 2774-2778.
- Goreau, T.G., Kaplan, W.A., Wofsy, S.C., McElroy, M.B., Valois, F.W., Watson, S.W. (1980). Production of NO₂ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 526-532.
- Von Schulthess, R., Wild, D., Gujer, W. (1994). Nitric and nitrous oxides from denitrifying activated sludge at low oxygen concentration. *Wat. Sci. Tech.* 30, 123-132.
- Osada, T., Kuroda, K., Yonoga, M. (1995). Reducing nitrous oxide gas emissions from fill-and-draw type activated sludge process. *Wat. Res.* 29, 1607-1608.
- Baumann, B., Snozzi, M., Zehnder, A.J.B., Van Der Meer, J.R. (1996). Dynamics of denitrification activity of *paracoccus denitrificans* in continuous culture during aerobic-anaerobic changes. *J. Bacteriol.*, 178 (15), 4367-4374.

37. Abrassart, J., Bertrand, M., Herve, A.M. (1993). Bilan global de l'azote, phosphore et potassium. Méthode pour une évaluation a différentes échelles (Global balance of nitrogen, phosphorus and potassium. Method for evaluating at various scales). Informations Techniques du CEMAGRE (France), 91, 1-8.
38. Tunney, H. (1994). Policies related to agriculture and environment in the European Community. Marine Pollution Bulletin 29, 508-514.
39. Anonymous (1996). Council Directive 96/61/EC of 24 September 1996 concerning integrated pollution prevention and control. Official Journal of the European Communities, L 257, 10/10/1996, 26-40.
40. Anonymous (1991). Council Directive 91/676/EC of 12 December 1991 concerning the protection of waters against pollution caused by nitrates from agricultural sources. Official Journal of the European Communities, L 375, 31/12/1991, 1-8.
41. Anonymous (2001). Council Directive 2001/81/EC of 23 October 2001 on national emission ceilings for certain atmospheric pollutants. Official Journal of the European Communities, L 309, 27/11/2001, 22-30.
42. Lenis, N.P. and Jongbloed, A.W. (1989). New technologies in low pollution swine diets: Diet manipulation and use of synthetic amino acids, phytase and phase feeding for reduction of nitrogen and phosphorus excretion and ammonia emissions. Asian-Austr. J. Anim. Sci. 12, n 305-327.
43. Paik, I.K., Blair, R. and Jacob, J. (1996). Strategies to reduce environmental pollution from animal manure: Principles and nutritional management - a review. Asian-Austr. J. Anim. Sci. 9, 67-75.
44. Everts, H. and Decker, R. (1994). Effect of nitrogen supply on the retention and excretion of nitrogen and on energy utilisation of pregnant sows. Anim. Prod. 59, 293-301.
45. Fuller, M.F., Livingstone, R.M., Baird, B.A., Atkinson, T. (1979) The optimal amino acid supplementation of barley for growing pig. 1. Response of nitrogen metabolism to progressive supplementation. Br. J. Nutr. 41, 321-33.
46. Valaja, J., Alaviuhkola, T. and Suomi, K. (1993). Reducing crude protein content with supplementation of synthetic lysine and threonine in barley-rape-seed meal-peal diets for growing pigs. Agric. Sci. Finl. 2, 117.
47. Tuitoek, K., Young, L.G., De Lange, C.E.M., Kerr, B.J. (1997). The Effect of reducing excess dietary amino acids on growing- finishing pig performance: An evaluation of the ideal protein concept. J. Anim. Sci. 75, 1575-1583.
48. Canh, T.T., Aarnink, A.J.A., Schutte, J.B., Sutton, A., Langhout, D.J. and Vestegen, M.W.A. (1998). Dietary protein affects nitrogen excretion and ammonia emission from slurry of growing-finishing pigs. Livest. Prod. Sci. 56, 181-191.
49. Robertson, J.F., Wilson, D. and Smith, W.J. (1990). Atrophic rhinitis: the influence of the aerial environment. Animal Production 50, 173-182.
50. Cole, D.J.A., Schuerink, G., de Koning, W.J. (1996). Ammonia in pig buildings in The Netherlands. Pig News Information. 17, 53-57.
51. Oldenburg, J., Heinrichs, P. (1996). Quantitative aspekte einer proteinreduzierten schweinemast. Lohmann Information, 113-21.
52. Sutton, A.L., Kephart, K.B., Patterson, J.A., Mumma, R., Kelly, Bogus, E., Don, B.S., Jones, D.D., Heber, A. (1997). Dietary manipulation to reduce ammonia and odorous compounds in excreta and anaerobic manure storage. In In: Voermans, J.A.M., Monteny, G.J. (Eds.), Ammonia and Odour Emission from Animal Production Facilities. Vinkeloord, The Netherlands. 245-252.
53. Kirchgessner, M., Kreuzer, M., Machmuller, A., and Roth- Maier, D. A. (1993). Evidence for a high efficiency of bacterial protein synthesis in the digestive tract of adult sows fed supplements of fibrous feedstuffs. Anim. Feed Sci. Technol. 46, 293.
54. Low, A. G. (1985). Role of dietary fibre in pig diets. In: W. Haresign and D.J.A. Cole (Eds.) Recent Advances in Animal Nutrition. p 87. Butterworths, London, UK.
55. Malmlof, K. (1985). Effects of wheat straw meal on some blood plasma variables in the growing pig. In: Pig research at the department of animal nutrition and management 1974-1984. Swedish University of Agricultural Science 152, 16.
56. Patience, J.F., Austic, R.E., and Boyd, R.D. (1987). Effect of dietary electrolyte balance on growth and acid-base status in swine. J. Anim. Sci. 64, 457.
57. Zervas, S. and Zijlstra, R.T. (2002). Effects of dietary protein and fermentable fiber on nitrogen excretion patterns and plasma urea in grower pigs. J. Anim. Sci., 80, 3247-3256.
58. Poulsen, H.D., and Oksberg, N. (1995). Effect of dietary inclusion of a zeolite (clinoptilolite) on performance and protein metabolism of young growing pigs. Anim. Feed Sci. Tech. 53, 297-303.
59. Kyriakis, S.C., D.S. Papaioannou, C. Alexopoulos, Z. Politopoulou, E.D. (2002). Experimental studies on safety and efficacy of the dietary use of a clinoptilolite-rich tuff in sows: a review of recent research in Greece. Micropor. Mesopor. Mat. 76, 65-74.
60. Pond, W.G., and Yen, J.T. (1982). Response of growing swine to dietary clinoptilolite from two geographic sources. Nutri. Rep. Int. 25, 837-848.
61. Pond, W.G. and Mersmann, H.J. (1990). Differential compensatory growth in swine following control of feed intake by a high-alfalfa diet fed ad libitum or by limited feed. J. Anim. Sci. 68, 352-362.
62. Nestorov, N. (1984) Possible applications of natural zeolites in animal husbandry. In: W.G. Pond and F.A. Mumpton (ed.) Zeo-Agriculture: use of natural zeolite in agriculture and aquaculture. International committee on natural zeolites. Westview Press, Boulder, CO. p. 163.
63. Sneath, R.W., Burton, C.H., Williams, A.G. (1992). Continuous aerobic treatment of piggery slurry for odour control scaled up to a farm-size unit. J. Agri. Eng. Res., 53, 81-92.
64. Evans, M.R., Smith, M.P.W. (1986a). Treatment of farm animal wastes. J. Appl. Bact. Symposium Supplement, 16 S, 27-41.
65. Curto, G.M. (1980). L'utilizzazione delle deiezioni di maiale. Allevamento del suino. Edagricole, 169-197.
66. Beline, F. and Martinez, J. (2002). Nitrogen transformations during biological aerobic treatment of pig slurry: effect of intermittent aeration on nitrous oxide emissions. Bioresource Technology, 83 (3), 225-228.
67. Molfino, M. (2003). Il liquame? Una risorsa da valorizzare. Rivista di suinocoltura 8, 39.
68. Visek, W.J. (1978). The mode of growth promotion by antibiotics. J. Anim. Sci., 46, 1447-1469.
69. Mumpton, F.A., Fishman, P.H. (1977). The application of natural zeolites in animal science and aquaculture. J. Anim. Sci; 45, 5.
70. El Mouzdaoui, Y., Elmchaoui, A., Mahboub, R., Gil, A., Korili, S.A. (2009). Synthesis of nano-layered vermiculite of low density by thermal treatment. Powder Technol. 189, 2-5.
71. Hurlbut, K. (1993). Manual of Mineralogy. 21st edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.
72. Harland CE. (1994). Ion Exchange: Theory and Practice. The Permutit Company Limited UK.
73. Borja, R., Sanchez, E., Duran, M.M., (1996). Effect of the clay mineral zeolite on ammonia inhibition of anaerobic thermophilic reactors treating cattle manure. J. Environ. Sci. Health 31 (2), 479-500.
74. Bernal, M.P., Lopez-Real, J.M., Scott, K.M. (1993). Application of natural zeolite for the reduction of ammonia emission during the composting of organic wastes in a laboratory composting simulator. Biores. Technol. 43, 35-39.
75. Bernal, M.P. and Lopez-Real, J.M. (1993). Natural zeolites and sepiolite as ammonium and ammonia adsorbent materials. Bioresource Technol., 43, 27-33.
76. Ma, M.D., Huang, W.Y., Wu, J.F., Fu, C.M. (1993). Effects of dietary deodorizers on the growth performance of finishing pigs and odour reduction in non-flushing piggeries. Journal of Agr. Ass. of Chin. 164, 89-97.
77. Barrington, S. and El Moueddeb, K. (1995). Zeolite to control swine manure odours and nitrogen volatilization. Proceedings of international livestock odour conference, Iowa State University, Ames, 65-68.
78. Saoulidis, K., Alexopoulos, C., Papaioannou, D.S., Kritas, S.K., Kyriakis, S.C. (2001). Effect of the dietary inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on aerial ammonia level in pig houses. J. Hell. Vet. Med. Soc. 52, 292-298.
79. Ward, T.L., Watkins, K.L., Southern, L.L., Hoyt, P., French, D.D. and Wiegand, K.E. (1989). Effect of sodium zeolite-A and (or) excess of Cu on growth performance, liver Cu concentration, gastric ulcers, carcass characteristics and serum metabolites in swine. J. Anim. Sci., 67 (2), 36-37.
80. Suhadolc, M., Kadunc, V., Lobnik, F. (1994). Adsorption of nutrients from pig slurry on expanded vermiculite. Zb. Bioteh. Fac. Univ. Ljublj., Kmet., 63, 165-175.
81. Pesenti-Barilli, B., Ferdani, E., Mosti, M., Degli-Innocenti, F. (1991). Survival of Agrobacterium radiobacter K84 on various carriers for crown gall control. Appl. Environ. Microbiol., 57, 2047-2051.
82. Turan, G., Akdemir, A. Ergun, O.N. (2009). Removal of volatile organic compounds by natural materials during composting of poultry litter. Bioresource Technol. 100, 798-803.
83. Stotzky, G. and Rem, L.T., (1966). Influence of clay minerals on microorganisms. I. Montmorillonite and kaolinite on bacteria. Can. J. Microbiol., 12, 547-563.
84. Geeta, G.S., Raghavendra, S. and Reddy, R. (1986). Increase in biogas production from bovine excreta by addition of various inert materials. Agri. Waster, 17, 153-156.
85. Wood J.D., Richardson R.L., Nute G.R., Fisher A.V., Campo M.M., Kasapidou E., Sheard P.R., Enser M. (2003). Effects of fatty acids on meat quality: a review. Meat Sci., 66 21-32.
86. Pearson, G., W.C. Smith, and J.M. Fox. (1985). Influence of dietary zeolite on pig performance over the live weight range 25-87 kg. New Zealand J. Exp. Agri. 13, 151-154.
87. Yannakopoulos, A., Terven-Gousi, A., Kassoli-Fournarakis, A., Tsirambides, A., Michailidis, K., Filippidis, A., Lutat, U. (2000). Effects of dietary clinoptilolite-rich tuff on the performance of growing-finishing pigs. In: Coela, C., Mumpton, F.A. (Eds.), Natural Zeolites for the Third Millennium. De Frede Editore, Napoli, Italy, pp. 471-481.
88. Papaioannou, D.S., Kyriakis, C.S., Alexopoulos, C., Tzika, E.D., Polizopoulou, Z.S., Kyriakis, S.C. (2004). A field study on the effect of the dietary use of a clinoptilolite-rich tuff, alone or in combination with certain antimicrobials, on the health status and performance of weaned, growing and finishing pigs. Res. Vet. Sci. 76, 119-29.
89. Fokas, P., Zervas, G., Fegeros, K., and Zoiopoulos, P. (2004). Assessment of Pb retention coefficient and nutrient utilization in growing pigs fed diets with added clinoptilolite. Anim. Feed Sci. Tech. 117, 121-129.
90. Long, V.P., Tarrant, P.V. (1990). The effect of pre-slaughter showering and post-slaughter rapid chilling on meat quality in intact pork sides. Meat Sci., 27, 181-195.
91. Vrzgula, L., and Bartko, P. (1984). Effects of clinoptilolite on weight gain and some physiological parameters of swine. In: W.G. Pond and F.A. Mumpton (Eds.) Zeo-agriculture: use of natural zelites in agriculture and aquaculture. International Committee on Natural Zeolites. Westview Press, Boulder, CO. 161-167.



Finadyne™
Transdermal

L'ANTINFIAMMATORIO **POUR ON** A SOMMINISTRAZIONE UNICA



**NIENTE DI PIÙ SEMPLICE DI FINADYNE™ TRANSDERMAL
IN CASO DI MASTITE O BRD**



Facile da somministrare



Rapida azione



Senza ago e iniezione

Finadyne™ Transdermal: Soluzione pour-on per bovini (flunixin 50 mg/ml). **Indicazioni:** Per la riduzione della febbre associata alla malattia respiratoria bovina e per la riduzione della febbre associata alla mastite acuta. **Posologia:** Uso pour-on. Per applicazione singola. La dose raccomandata per il trattamento è 1 ml/15 kg p.v. Leggere le istruzioni prima della somministrazione agli animali. **Tempi di attesa:** Carni e visceri: 7 giorni; Latte: 36 ore. **Controindicazioni e reazioni avverse:** Non utilizzare in animali affetti da malattie cardiache, epatiche o renali, o dove vi sia evidenza di ulcere o sanguinamento gastrointestinali; in animali gravemente disidratati, ipovolemici poiché vi è il rischio di un aumento della tossicità renale. Non utilizzare il prodotto nelle 48 ore precedenti la data prevista del parto. Non usare in caso di ipersensibilità al principio attivo o ad uno degli eccipienti. Sono stati riportati al sito di applicazione: Gonfiore transitorio, eritema, desquamazione, fragilità e/o rottura del pelo, ipotricosi, alopecia o ispessimento cutaneo. Non è generalmente richiesto alcun trattamento specifico. Alcuni animali possono presentare sintomi transitori di irritazione, agitazione o disagio a seguito dell'applicazione del prodotto. **Presentazioni:** Flacone da 100 ml, 250 ml e 1000 ml. **Dispensazione:** RNRT.

futuro metabolico

grandi dimensioni + lenta dissoluzione
per prevenire - compensare - proteggere

Bovibol® PARTO

compensa le carenze al parto

88 g di Ca, 49.000 U.I. di Vit. D₃
+ 1 MJ di energia in 24 ore

Bovibol® P

compensa la ipofosfatemia

31 g di P + 20 g di Ca in 8 ore

Bovibol® K

compensa la ipocaliemia

100 g di KCl + 5 g di Mg in 12 ore

Bovibol® KETOSI

compensa la chetosi - protegge il fegato

48 g di niacina + 45 g di Mg in 4 giorni



Bovibol PARTO - Mangime complementare dietetico in boli ruminanti a dissoluzione lenta per bovine da latte. Composizione: calcio formiato, ossido di magnesio. Additivi nutrizionali per kg: Vitamina D₃ 121.287 U.I. Istruzioni per l'uso: somministrare 2 boli il giorno del parto. Peso netto: 202 g. Prezzo al pubblico consigliato: € 8,33 IVA escl.

Bovibol P - Mangime complementare minerale in boli ruminanti a dissoluzione lenta per bovine da latte. Composizione: fosfato di calcio, glicole propilenico. Istruzioni per l'uso: somministrare da 1 a 2 boli ogni 8 ore secondo necessità. Peso netto: 195 g. Prezzo al pubblico consigliato: € 11,10 IVA escl.

Bovibol K - Mangime complementare minerale in boli ruminanti a dissoluzione lenta per bovine da latte. Composizione: Potassio cloruro, magnesio cloruro, ossido di magnesio. Istruzioni per l'uso: somministrare da 1 a 2 boli ogni 12 ore secondo necessità. Peso netto: 190 g. Prezzo al pubblico consigliato: € 10,34 IVA escl.

Bovibol KETOSI - Mangime complementare in boli ruminanti a dissoluzione lenta per bovine da latte. Composizione: magnesio cloruro, magnesio ossido. Additivi nutrizionali per kg: nicotinamide (niacina) 160.000 mg. Istruzioni per l'uso: somministrare 2 boli con l'apposito lanciaboli come supporto della terapia parenterale della chetosi clinica, o di valori anomali di beta - idrossibutirato (BHBA), o in caso di inappetenza e calo della produzione. Ripetere dopo 4 giorni se necessario. Peso netto: 150 g. Prezzo al pubblico consigliato: € 9,39 IVA escl.

ZAC
ZOOTECNIA DOMANI

www.zacvet.com

Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy donkeys in Central Italy



F. LAUS*, V. FAILLACE*, A.R. ATTILI, A. SPATERNA, B. TESEI, V. CUTERI

School of Biosciences and Veterinary Medicine, University of Camerino

*These authors contribute equally to the work

SUMMARY

Introduction - The normal eye microflora is composed of several species of fungi and bacteria. If the ocular defense barriers become weak, they can act as pathogens and cause infections. Therefore, characterization of conjunctival normal flora is essential in making diagnosis and treating eye infections. Bacterial and fungal flora of the normal eye has been reported for different mammals but few studies concerning donkeys are available.

Aim - To evaluate the bacterial and fungal flora of healthy eyes of donkeys (*Equus asinus*) reared in three different Areas in Central Italy.

Materials and methods - One hundred-fourteen mixed breed donkeys (93 females, 21 males) housed in Marche, Umbria and Lazio Region were included in the study and sampled on the ventral conjunctival fornix. Age ranged between 4 months and 16 years (mean: 7.3 years, SD \pm 8.6). Animals were divided into three categories: foals: \leq 1 year, n = 35; young: 1 < age \leq 3 years, n = 9; and adult: \geq 3 years, n = 70.

Results and discussion - Twenty-one different bacteria genus and thirteen fungi/yeasts were isolated. The emergent *Kocuria* spp. was isolated in 61 cases. None significant effect of gender on bacterial and fungal isolation was observed. Significantly lower bacterial load was recorded in foals than adult donkeys. In relation to the Areas, differences were observed both for bacterial and fungal mean loads.

Conclusion - The area in which donkeys are reared seems to be a significant factor influencing the conjunctival bacterial and fungal flora loads. The emerging human pathogen bacteria *Kocuria* spp. was isolated for the first time in donkeys. In the present study, new important information to facilitate the diagnosis of eye disease in an emergent species like donkeys are provided.

KEY WORDS

Bacteria, conjunctiva, donkey, fungi, *Kocuria*.

INTRODUCTION

Equids have relatively large, prominent eyes, which are susceptible to be damaged by straw or dirt from the environment resulting in more frequently observed ocular infections than in other domestic animals.^{1,2}

Animal and human eye microflora is normally composed by several species of fungi and bacteria that remain in a balance with immunity system of the host.^{3,4,5} The resident microbial flora contributes in preventing overgrowth of pathogenic bacteria but if the ocular defense barriers become weak, they may act as pathogens and cause infections.⁶ If a corneal abrasion occurs, these non-pathogenic microorganisms may infiltrate the corneal stroma and result in keratitis or in infected corneal ulceration usually difficult to treat.^{7,8} Therefore, characterization of conjunctival normal flora may be useful in treating eye infections. Bacterial and fungal flora of the normal eye has been reported for different mammals but few studies concerning donkeys are available.^{1,9,10,11,12,13,14} It is known that microbial population of the horses' ocular surface is influenced by factors such as gender, geographic location and housing, so findings from

individual studies may not be applicable to animals reared in other Areas of the world.^{4,13,15,16,17} Furthermore, equine corneal diseases can be affected by seasonal factors such as temperature and humidity.¹⁸

The aim of this study was to evaluate the bacterial and fungal flora of healthy eyes of mixed breed donkeys (*Equus asinus*) living in the Marche, Umbria and Lazio Regions (Central Italy).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Between April 2014 and October 2014, 114 mixed breed donkeys (93 females, 21 males) housed in Central Italy (Fig. 1) were included in the study. Age ranged between 4 months and 16 years (mean: 7.3 years, SD \pm 8.6). Animals were divided into three age categories: foals: \leq 1 year, n = 35; young: 1 < age \leq 3 years, n = 9; and adults: \geq 3 years, n = 70. For each animal physical and ophthalmic examinations were performed. Only animals with none history or clinical signs related to eye disorders were included in the study.

Areas of sampling

Geographical distribution of sampled animals is reported in Figure 1.

Autore per la corrispondenza:
Fulvio Laus (fulvio.laus@unicam.it).

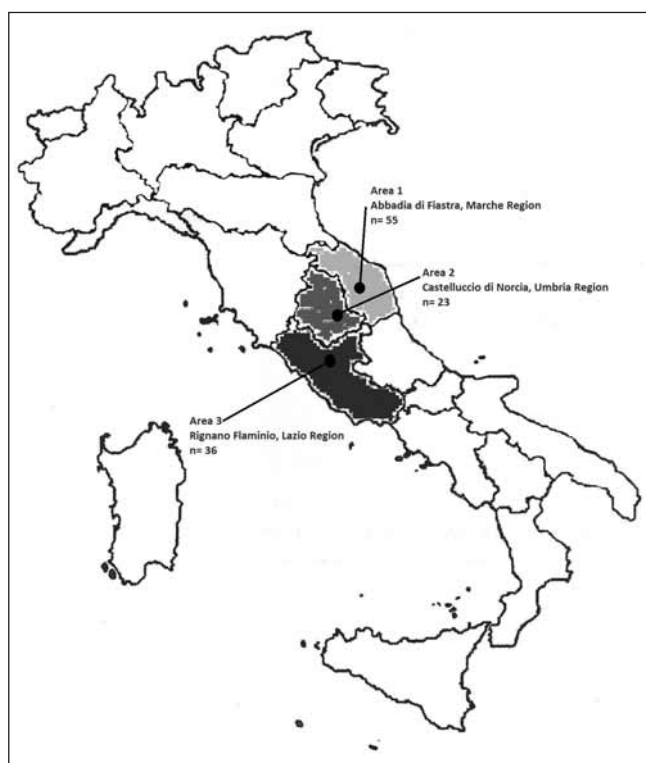


Figure 1 - Areas of sampling and geographical distribution of animals.

Area 1. Abbadia di Fiastra (43°13'17"N, 13°24'19"E), Marche Region. Animals in this farm (n = 55) were reared in large paddocks with graze access and hay available *ad libitum*. Milking was performed once a day with automatic machine. Area 2. Castelluccio di Norcia (42°49'44"N, 13°12'21"E), Umbria Region. Animals (n = 23) were reared at pasture, eating grass with no food integration, and used for onotherapy and trekking.

Area 3. Rignano Flaminio (42°12'00"N, 12°29'00"E), Lazio Region. Animals in this farm (n = 36) were reared with a semi-intensive system, housed in small paddock to allow separation between different category based on age and month of lactation. Milking was performed twice a day with automatic machine.

The temperature in all Areas during the sampling period ranged from 9.6 °C to 18.2 °C, humidity ranged from 72.1%, and 84.2%, wind ranged from 3 km/h to 17 km/h (Source: <http://clima.meteoam.it>, Military Aviation website).

Sampling

Conjunctival samples were obtained without sedation, nerve blocks or topical anesthetics. By retropulsing the eye through the closed upper eyelid and running a sterile swab along the surface of the ventral conjunctival fornix, two ocular specimens from each eye were obtained. Special care was taken to ensure that the swabs did not come into contact with the vibrissae, eyelids or eyelashes. Samples were placed in a cooled box and delivered to the laboratory within 2-4 hrs.

Laboratory analysis

For bacteriological examination, one conjunctival swab was aseptically putted into a sterile tube containing 1 mL of 0.9% saline solution (Oxoid, Milan, Italy), left for 5 minutes at room temperature and then vortexed for 30 seconds. An ali-

quot, 100 µL, was spread onto Columbia agar plate containing 5% sheep blood, with and without *Streptococcus* supplement, Mannitol Salt agar, Mac Conkey agar, *Pseudomonas* Cetrimide agar and *Burkholderia cepacia* selective agar (Oxoid, Milan, Italy). Plates were incubated at 37 °C for 24-72 hrs. in aerobic conditions. Gram-positive bacteria were identified using Gram staining, catalase and coagulase test, colony morphology, and biochemical gallery (Remel RapID, Oxoid, Milan, Italy). Gram-negative bacteria were identified by selective media agar, Gram staining, oxidase test, and biochemical gallery (Remel Rapid ID, Oxoid, Milan, Italy). Samples for mycological investigation were maintained in 1 mL of sterile saline solution with 50 µL/mL gentamicin and stored at 4 °C for 24 hrs. An aliquot, 100 µL, was spread on Sabouraud dextrose agar (SDA, Oxoid, Milan, Italy), incubated at 25 °C and examined daily over a 21-day period. *Aspergillus* species were identified following Rapper and Fennel's keys (1965) while the identification of other filamentous fungi was achieved to the genus level.¹⁹ Yeast colonies were identified by macro- and micro-morphologic characteristics and on the basis of physiologic characteristics, such as presence of capsule by India Ink testing, urease production at 25 °C, and the germ tube test. On all isolates the Carbohydrate assimilation test was performed.

On each plate, the number of colony forming unit (CFU), was converted into number of bacteria/fungi per 1 mL of saline solution (equal to the number of flora per eye) using the equation by Ferguson *et al.* (2003).²⁰

Statistical analysis

Effects of age, gender, and environment, on bacterial and fungal frequency isolation were determined using χ^2 test and an independent-samples student's *t*-test. A multivariate analysis was performed considering three variables: the age, the gender, and the environment. *P*- values less than 0.05 were considered significant. To calculate the sample size the Cannon and Roe's (1982) formula was used, considering a population of about 1,000 donkeys (source: <http://statistiche.izs.it>), an estimated prevalence of infection of 2.5%, and a degree of confidence of 95%.²¹ Data were analysed using a statistical software program (STATA, version 13; STATA Corporation, College Station, Texas, USA).

RESULTS

Twenty-one different bacteria genus (Table 1) and thirteen fungi/yeasts were found (Table 2). All eyes were positive for at least one microorganism, except for the 5.9% of eyes of donkeys reared in Area 2. A total of 0.9% (n = 6) and 13.8% (n = 50) of eyes resulted negative for bacteria and fungi/yeasts, respectively.

Significant differences for each microorganism and fungi/yeasts per Area are reported in Tables 1 and 2.

None significant effect of gender and age on bacterial and fungal isolation frequency (*P* > 0.05) was observed. Male (21136.8 ± 98439.2) and female animals (31553.5 ± 120329.1; *t* = -0.9204, *P* = 0.36) had similar bacterial and fungal mean loads (Fig. 2), while foals revealed a significantly lower bacterial load (7924.8 ± 18132.2) than adult donkeys (41281.7 ± 138165.7; *t* = -3.3985, *P* = 0.001) (Fig. 3). In relation to the Area, differences were observed both for

Table 1 - Bacterial eye prevalence (%) and CFU/eye mean (\pm SD).

Bacteria	Frequency (N)	Prevalence (%)	CFU/eye ($\times 10^2$) - Mean (\pm SD)		
			Area 1	Area 2	Area 3
<i>Staphylococcus aureus</i>	91	13.9	0.6* (\pm 1.6)	1434.5* (\pm 3464.0)	–
<i>S. intermedius</i> group	3	0.4	0.05 (\pm 0.001)	–	–
<i>S. epidermidis</i>	46	7.0	0.2* (\pm 0.4)	518.9* (\pm 1059.8)	2357.2* (\pm 2595.8)
<i>S. hyicus</i>	22	3.4	0.5* (\pm 0.7)	626.8* (\pm 1248.8)	6150.0* (\pm 919.2)
<i>Kocuria rosea</i>	21	3.2	0.1* (\pm 0.08)	148.2* (\pm 540.2)	–
<i>K. kristinae</i>	40	6.1	–	–	730.1 (\pm 1277.6)
<i>Micrococcus</i> spp.	1	0.1	–	0.2 (\pm 0.1)	–
<i>Trueperella pyogenes</i>	83	12.7	0.3* (\pm 0.4)	1.4* (\pm 0.1)	178.1* (\pm 163.7)
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	37	5.6	0.4 (\pm 0.4)	2.8 (\pm 550.3)	–
<i>Actinomyces</i> spp.	2	0.3	–	0.4* (\pm 0.1)	96.0* (\pm 0.1)
<i>Streptococcus</i> spp. γ	3	0.4	0.05 (\pm 0.001)	–	–
<i>S. constellatus</i>	22	3.3	–	–	965.6 (\pm 2160.7)
<i>Enterococcus</i> spp.	43	6.5	–	716.7 (\pm 1126.8)	820.1 (\pm 1801.7)
<i>Bacillus cereus</i>	67	10.1	0.09* (\pm 0.07)	1.2* (\pm 0.1)	–
<i>B. subtilis</i>	96	14.5	0.08* (\pm 0.04)	356.3* (\pm 854.4)	969.3* (\pm 2704)
<i>B. licheniformis</i>	63	9.5	0.1* (\pm 0.1)	180.9* (\pm 623.3)	154.7* (\pm 426.1)
<i>B. thuringiensis</i>	4	0.6	0.1 (\pm 0.001)	–	0.2 (\pm 0.1)
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	0.1	–	0.5 (\pm 0.1)	–
<i>Shigella</i> spp.	6	0.9	–	0.3 (\pm 0.3)	–
<i>Leminorella grimontii</i>	1	0.1	–	0.3 (\pm 0.1)	–
<i>Klebsiella</i> spp.	2	0.3	–	0.5 (\pm 0.1)	–
Negative eyes	6	1.0			
Total	610	100			

Legend: * $P < 0.05$

Table 2 - Fungal eye prevalence (%) and CFU/eye mean (\pm SD).

Fungi and Yeast	Frequency (N)	Prevalence (%)	CFU/eye - Mean (\pm SD)		
			Area 1	Area 2	Area 3
<i>Absidia</i> spp.	8	2.2	10.0 \pm 5.8	10.0 \pm 0.1	46.7 \pm 15.3
<i>Acremonium</i> spp.	6	1.7	10.0 \pm 0.1	–	–
<i>Alternaria</i> spp.	13	3.6	5.0 \pm 0.1	–	18.0 \pm 8.4
<i>Aspergillus flavus</i>	23	6.4	6.1 \pm 2.2*	110.0 \pm 86.0*	7.0 \pm 0.1
<i>A. nidulans</i>	44	12.3	10.0 \pm 5.5	18.0 \pm 17.9	–
<i>A. niger</i>	5	1.4	5.0 \pm 0.1*	470.0 \pm 0.1*	35.0 \pm 35.3
<i>A. ochraceus</i>	22	6.2	8.3 \pm 4.4	55.0 \pm 63.6	20.0 \pm 20.7
<i>A. penicilloides</i>	15	4.2	9.6 \pm 5.2	20.0 \pm 14.1	–
<i>A. terreus</i>	16	4.5	5.0 \pm 0.1*	565.7 \pm 1291.7*	10.0 \pm 0.1
<i>Mucor</i> spp.	49	13.7	6.1 \pm 2.1	23.3 \pm 20.6	27.5 \pm 24.2
<i>Penicillium</i> spp.	23	6.4	6.7 \pm 2.5	20.0 \pm 0.1	12.0 \pm 6.3
<i>Pichia anomala</i>	63	17.6	23.4 \pm 32.3*	185.7 \pm 255.6*	302.1 \pm 445.7*
<i>Rhodotorula</i> spp.	20	5.6	12.5 \pm 6.2	–	–
Negative eyes	50	13.8	–	–	–
Total	357	100			

Legend: * $P < 0.05$

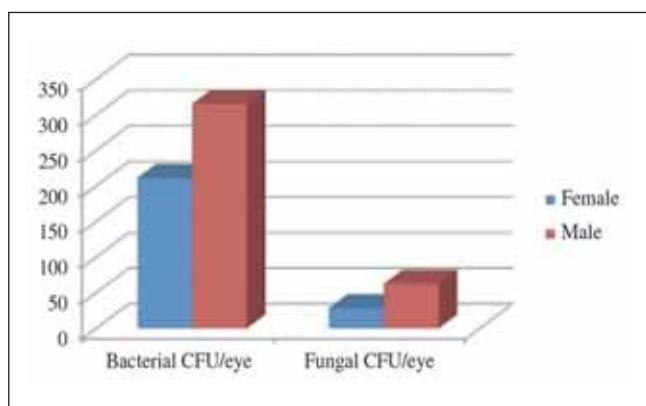


Figure 2 - Bacterial ($\times 10^2$) and fungal mean CFU/eye in relation to the gender.

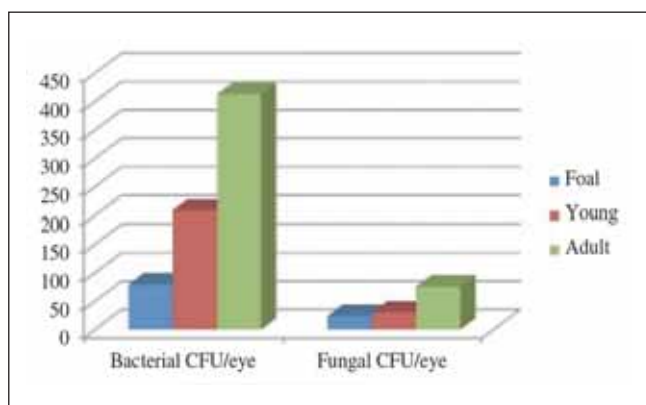


Figure 3 - Bacterial ($\times 10^2$) and fungal mean CFU/eye in relation to the age.

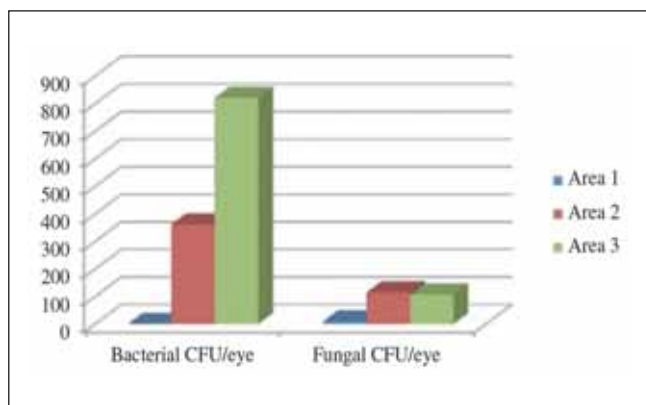


Figure 4 - Bacterial ($\times 10^2$) and fungal mean CFU/eye in relation to the Areas.

bacterial and fungal mean loads between Areas 1-2 (bacteria $t = -5.758$, $P < 10^{-4}$; fungi $t = -3.1638$, $P = 0.002$); Areas 1-3 (bacteria $t = -8.45$, $P < 10^{-4}$; fungi $t = -4.8116$, $P < 10^{-4}$); and between Areas 2-3 only for bacteria mean load: $t = -2.2528$, $P = 0.02$ (Fig. 4).

Analysing the data by Area, in the Lazio and Umbria Region the higher bacterial and fungal mean loads were recorded; in particular, in the Area 1, significant differences were recorded for bacteria (CFU/eye) between foals (16.1 ± 27.7) and adult donkeys (39.5 ± 106.7 ; $t = -2.3304$, $P = 0.02$), and for fungal flora both between foals (13.2 ± 19.5) and adult ani-

mals (7.86 ± 5.0 ; $t = 2.7494$, $P = 0.01$), than between youngs (3.3 ± 2.4) and adult ones (7.9 ± 5.0 ; $t = -3.4156$, $P = 0.001$). Analysing the Area 2, significant differences were observed only for bacterial loads between foals (1129.8 ± 2232.5) and adult animals (41295.1 ± 90383.3 ; $t = -2.0760$, $P = 0.04$). In Area 3, the eyes of adult donkeys had more bacterial mean load (107513.0 ± 218993.0) than foals (25970.2 ± 25173.0 ; $t = -2.8716$, $P = 0.004$), and slight differences were found for fungal mean load (26.1 ± 27.1 vs 143.8 ± 336.2 ; $t = -2.0040$, $P = 0.048$).

In relation to the gender, only in the Area 1 female (33.4 ± 94.0) had a slightly significant greater bacterial mean load than male donkeys (12.5 ± 11.4 ; $t = -1.9793$, $P = 0.048$).

The statistical analysis carried out by age, confirmed that the higher bacterial loads were in the Area 3 both for foals ($t = -11.2307$, $P > 10^{-4}$) and adult donkeys ($t = -7.1519$, $P > 10^{-4}$); while in the Area 2 the donkeys showed the higher fungal loads with significant differences in foals ($t = -3.8666$, $P = 0.0002$) and adults ($t = -2.4509$, $P = 0.01$).

The multivariate analysis confirmed that the Area in which donkeys were reared is the significant factor influencing the conjunctival bacterial and fungal flora mean loads ($P < 10^{-4}$).

DISCUSSION

Staphylococcus spp. strains were confirmed as the most prevalent opportunistic Gram-positive bacteria isolated from conjunctival swabs in animals.^{4,14,17,22}

On the contrary, the isolation of *Kocuria* spp. was never recorded in previous studies. These catalase-positive and coagulase-negative, Gram-positive, coccoid bacteria are usually found as tetrads and irregular clusters. Bacteria of genus *Kocuria* belongs to the family *Micrococcaceae*, order *Actinomycetales*, class *Actinobacteria* and are frequently found as normal skin and oropharynx commensals in humans and other mammals.^{23,24,25} *Kocuria* spp. have been ascertained as responsible for several human infections, mostly in immunocompromised hosts and it is considered an emerging microbe since 5 of the 19 species in this genus are known to be opportunistic pathogen.^{25,26} The documented infections caused by *Kocuria* spp. in humans are limited but many cases might have been missed owing to their misidentification as *Staphylococcus* spp. due to the inadequate biochemical tests and to the automated identification systems.^{25,26,27}

If donkeys can be a potential source of infection for themselves or for other animals will require further investigations. In a previous study performed in donkeys, the prevalent bacteria isolated were *Staphylococcus* spp., and *Enterobacter* spp. among the *Enterobacteriaceae* family.¹⁴ The study was performed in South Italy, with a Mediterranean warm climate, in semi-intensive stables, and the Authors did not isolate bacteria such as *Corynebacterium* spp. or *Bacillus* spp., instead found in the present study. The findings reported by Foti *et al.* (2012) were more similar to those recorded in the Area 2 of our work.¹⁴ However, climate and housing of Area 2 were very different from that of the cited study and it is possible that different variables have influenced the results, such as seasonal sampling, not evaluated in this study.

Aspergillus spp., *Mucor* spp. *Penicillium* spp., and the yeast *Pichia anomala*, were the more represented fungal flora, as reported in horses.¹⁷ *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. and yeasts have

been predominantly isolated from conjunctiva and cornea of healthy horses.^{4,7,16,28} In the present study, *Aspergillus* spp. was isolated from 35% of healthy eyes, in accordance with surveys carried out on Amiata donkeys and in horses.^{1,4,12,29} Furthermore, a high percentage (17.6%) of isolations was observed for the yeast *Pichia anomala*, close to the 11% recorded by Nardoni *et al.* (2007), but much higher if compared with that observed in horses.^{12,16,29} This high frequency of *Pichia anomala* could be a typical feature of donkeys and should be further investigated.

In this study the Authors have compared results with those of a previous one performed on horses living in the similar geographic Area, and with the same climate, showing that the donkeys' conjunctiva is more colonized by fungi than those of horses, even if this difference is not significant.²⁹

In the present study, no differences between male and female have been found, except for the Area 1 where a weak significant difference was observed. An explanation for this data cannot be provided and only an influence of the hormonal stress of pregnancy can be supposed.

The study revealed Gram-negative flora only in the Area 2 where young donkeys were positive for *Shigella* spp. and *Klebsiella* spp., while adult donkeys were positive to all the four Gram-negative isolated bacteria (*Pantoea agglomerans*, *Shigella* spp., *Leminorella grimontii*, and *Klebsiella* spp.). Foals from the three Areas had an exclusive Gram-positive flora. Moreover, a significant increasing trend of mean bacterial load with age has been found in each Area, with higher mean bacterial load in adult donkeys reared in the Area 3 and higher mean fungal load in adult donkeys reared in the Area 2.

The effect of gender and age on bacteria and fungi presence has not been evaluated in none of the previous studies performed on donkey but some variability regarding frequency and composition of conjunctival flora in relation to the age has been reported for horses.^{4,12,14,29,30}

In a study, performed in UK on conjunctival bacteria and fungi, no differences were found in horses for age and gender, but animals with Gram-negative bacteria were older than horses with Gram-positive bacteria.¹⁷ On the contrary, Andrew *et al.* (2003) found young horses having an increased incidence of Gram-negative bacteria other than fungal isolations.⁴ Khosravi *et al.* (2014) did not find any differences for fungal isolation in relation to age and gender in Iranian horses.³⁰ However, they found Caspian miniature horses having the highest mean CFU compared with other breeds and explained these findings with the closer contact with food because of their small size. Such statement concerning the size could account for differences found in donkeys and foals. According with the present study, surveys carried out in horses in Central Italy and in Brazil failed to find age differences on positivity for fungal isolation.^{16,28,29} Although the lack of difference between males and females can therefore now be proposed, the meaning of differences among age categories needs further investigation in domestic Equids.

Many studies have tried to analyse the factors affecting the normal equine conjunctival flora in horses. Andrew *et al.*, (1998) state that geographic location, environmental and husbandry conditions influence the presence or absence of fungal flora, such as the mycotic burden.³¹ One study from Brazil showed an increasing incidence of fungi in stabled

animals compared those that were reared outside, similar to the findings of another study performed in USA where a higher fungal prevalence was associated with dust, humidity and hygiene issues in the stables.^{7,16} In contrast to these reports, in a study conducted in Switzerland, differences between stabled and outdoor horses were not found, but the Authors consider that the prevalence of certain fungal species was influenced by the different type of housing and bedding.³² In the present paper, donkeys reared on pasture, resulted to have a higher burden of microflora confirming that environmental influence on ocular cultures has not yet been established and needs further investigations. However, seems to be ascertained that warmer season causes a higher fungal prevalence.^{17,29,32} Whitley *et al.* (1983) suggested that the low percentage of conjunctival isolations obtained during cold conditions could be due to the less amount of dust, pollens and flies in comparison with warmer periods.³³ Another study performed in the same Area but during the summer, gave a higher percentage of positivity.⁷ Differently, effect of season on conjunctival isolation was not found by Andrew *et al.* (2003).⁴

Sampling in this study was performed in different months during the year, but never in extremely cold or hot conditions. This could account for a preeminent influence of housing respect to the climate when differences for fungal and bacterial isolations among studied Areas were evaluated and could be supposed that differences found among the three Areas were due to the management (greater overcrowding in the Area 3, feeding with hay, more time spent in closed environments in Areas 1 and 3) rather than the climate.

CONCLUSIONS

Microorganisms never isolated before in donkey's conjunctiva have been detected in this study, and others have been confirmed. Hypotheses for these differences are provided. The identification of new potentially pathogenic species should encourage research in this regard.

The influences of subjective and environmental factors on conjunctival microflora have been partially studied in horse but the data are very scarce in donkeys. Since the comparison between horses and donkeys is never completely appropriate, further studies are needed to establish how the variables affect the conjunctival flora in donkeys and consequently the pathophysiology of diseases involving the eye structures.

References

1. Samuelson D.A., Andresen T.L., Gwin R.M. (1984) Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 184:1240-1242.
2. Ihrke P.J., Wong A., Standard A.A., Vivrette S.L. (1988) Cutaneous fungal flora in twenty horses free of skin or ocular disease. *Am J of Vet Res*, 49:770-772.
3. Klotz S.A., Penn C.C., Negvesky G., Butrus S.I. (2000) Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev*, 13:662-685.
4. Andrew S.E., Nguyen A., Jones G.L., Brooks D.E. (2003) Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Vet Ophthalmol*, 6:45-50.
5. Bonelli F., Barsotti G., Attili A.R., Mugnaini L., Cuteri V., Preziuso S., Corazza M., Preziuso G., Sgorbini M. (2014) Conjunctival bacterial and fungal flora in clinically normal sheep. *Vet Rec Open*, doi:10.1136/vropen-2013-000017.

6. Galan A., Martin Suarez E.M., Gallardo J.M., Molleda J.M. (2009) Clinical findings and progression of 10 cases of equine ulcerative keratomycosis (2004-2007). *Equine Vet Educ*, 21:236-242.
7. Moore C.P., Heller N., Majors L.J., Whitley R.D., Burgess E.C., Weber J. (1988) Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *Am J Vet Res*, 49:773-777.
8. Brooks D.E and Matthews A.G. (2007) Equine Ophthalmology. In Gelatt KN (Ed.), *Veterinary ophthalmology*, 4th ed., 1165-1274, Blackwell Pub, Ames, IA.
9. Spradbrow P.B. (1968) The bacterial flora of the ovine conjunctival sac. *Aust Vet J*, 44:117-118.
10. Davidson H.J., Rogers D.P., Yeary T.J., Stone G.G. (1994) Conjunctival microbial flora of clinically normal pigs. *Am J Vet Res*, 55:949-951.
11. Cooper S.C., McLellan G.J., Rycroft A.N. (2001) Conjunctival flora observed in 70 healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec*, 149:232-235.
12. Nardoni S., Sgorbini M., Barsotti G., Corazza M., Mancianti F. (2007) Conjunctival fungal flora in healthy donkeys. *Vet Ophthalmol*, 10:207-210.
13. Khosravi A.R., Shokri H., Sharifzadeh A. (2009) Fungal Flora of the eye and nose of healthy dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Iran. *J Camel Pract Res*, 16:63-67.
14. Foti M., Fisichella V., Giacobello C. (2012) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the microbial flora from the conjunctiva of healthy donkeys from Sicily (Italy). *Vet Ophthalmol*, 16:89-92.
15. Kang-Moon Seo K.M., Bedford P.G.C. (1998) Conjunctival fungal flora of the clinically normal pony eye: including *Nocardia* and *Streptomyces* species. *Korean J Vet Res* (Korea Republic), 38:217-225.
16. Rosa M., Cardozo L.M., da Silva Pereira J., Brooks D.E., Martins A.L., Florido P.S., Stussi J.S. (2003) Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Ophthalmol*, 6:51-55.
17. Johns I.C., Baxter K., Boole H. (2011) Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Vet Ophthalmol*, 14:195-199.
18. Hendrix D.V., Brooks D.E., Smith P.J., Gelatt K.N., Miller T.R., Whitaker C., Pellicane C., Chmielewski N. (1995) Corneal stromal abscesses in the horse: a review of 24 cases. *Equine Vet J*, 27:440-447.
19. Rapper K.B. and Fennel D.I. (1965) The Genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Company, Baltimore.
20. Ferguson A.W., Scott J.A., McGavigan J., Elton R.A., McLean J., Schmidt U., Kelkar R., Dhillion B. (2003) Comparison of 5% povidone-iodine solution against 1% povidone-iodine solution in preoperative cataract surgery antisepsis: a prospective randomized double blind study. *Br J Ophthalmol*, 87:163-167.
21. Cannon R.M. and Roe R.T. (1982) *Livestock Disease Surveys: a field Manual for Veterinarians*. Australian Government Publishing Service, Canberra.
22. Mouney M.C., Stiles J., Townsend W.M., Guptill L., Weese J.S. (2015) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. in the conjunctival sac of healthy dogs. *Vet Ophthalmol*, 18:123-126.
23. Altuntas F., Yildiz O., Eser B., Gündogan K., Sumerkan B., Cetin M. (2004) Catheter-related bacteremia due to *Kocuria rosea* in a patient undergoing peripheral blood stem cell transplantation. *BMC Infect Dis*, 4:62.
24. Zhou G., Luo X., Tang Y., Zhang L., Yang Q., Qiu Y., Fang C. (2008) *Kocuria flava* sp. nov. and *Kocuria turfanensis* sp. nov., airborne actinobacteria isolated from Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58:1304-1307.
25. Savini V., Catavittello C., Masciarelli G., Astolfi D., Balbinot A., Bianco A., Febbo E., D'Amaro C., D'Antonio D. (2010) Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus *Kocuria*. *J Med Microbiol*, 59:1395-1402.
26. Purty S., Saranathan R., Prashanth K., Narayanan K., Asir J., Sheela Devi C., Kumar Amarnath S. (2013) The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. *Emerging Microbes & Infections*, <http://doi.org/10.1038/emi.2013.93>
27. Ben-Ami R., Navon-Venezia S., Schwartz D., Carmeli Y. (2003) Infection of a ventriculoatrial shunt with phenotypically variable *Staphylococcus epidermidis* masquerading as polymicrobial bacteremia due to various coagulase-negative *Staphylococci* and *Kocuria varians*. *J Clin Microbiol*, 41:2444-2447.
28. Sgorbini M., Barsotti G., Nardoni S., Mancianti F., Rossi S., Corazza M. (2008) Fungal flora of normal eyes in healthy newborn foals living in the same stud farm in Italy. *J Equine Vet Sci*, 28:540-543.
29. Barsotti G., Sgorbini M., Nardoni S., Corazza M., Mancianti F. (2006) Occurrence of fungi from conjunctiva of healthy horses in Tuscany. *Vet Res Commun*, 30:903-906.
30. Khosravi A.R., Nikaein D., Sharifzadeh A., Gharagozlou F. (2014) Ocular fungal flora from healthy horses in Iran. *J Mycol Med*, 24:29-33.
31. Andrew S.E., Brooks D.E., Smith P.J., Gelatt K.N., Chmielewski N.T., Whittaker C.J. (1998) Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1987-1996). *Equine Vet J*, 30:109-116.
32. Voelter-Ratson K., Monod M., Unger L., Spiess B.M., Pot S.A. (2014) Evaluation of the conjunctival fungal flora and its susceptibility to antifungal agents in healthy horses in Switzerland. *Vet Ophthalmol*, 17:31-36.
33. Whitley R.D., Burgess E.C., Moore C.P. (1983) Microbial isolates of the normal equine eye. *Equine Vet J*, 2:138-140.



In collaborazione con



ITINERARIO FORMATIVO OVICAPRINI

PARASSITOLOGIA APPLICATA NEGLI ALLEVAMENTI OVINI E CAPRINI: DALLA DIAGNOSI IN LABORATORIO E IN CAMPO ALLE STRATEGIE DI CONTROLLO

7-9 Luglio 2016 - CREMOPAR (Eboli, SA)

GESTIONE RIPRODUTTIVA NELL'ALLEVAMENTO OVINO E CAPRINO: ECOGRAFIA E ALIMENTAZIONE. IL SISTEMA SEMENTUSA

20-24 Luglio 2016 - Villasalto (Cagliari)



SEGRETERIA ORGANIZZATIVA: SIVAR: Tel. 0372 - 40.35.39 - Fax 0372 - 40.35.54 - info@sivarnet.it - www.sivarnet.it

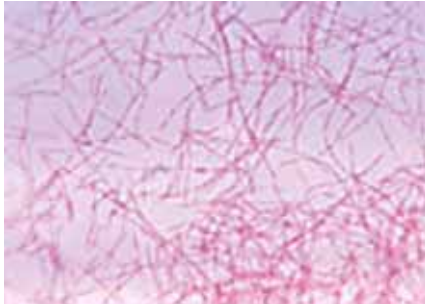
Per Informazioni sugli obiettivi e finalità dei corsi e come raggiungere le sedi di svolgimento degli eventi consultare il sito www.sivarnet.it - voce "Corsi 2016".
Eventi a numero chiuso con un massimo di 15 partecipanti.

LA RASSEGNA DI VET-JOURNAL

Rubrica a cura di Maria Grazia Monzeglio

Le notizie di Vet-Journal
sono consultabili on line all'indirizzo
http://www.evsrl.it/vet_journal/
• Notizie scientifiche
Archivio bibliografico • Servizio Cytovet

vet journal
Aggiornamento
scientifico permanente
in medicina veterinaria



Microbiota uterino postpartum della bovina da latte

Le biopsie endometriali, aggiunte al lavaggio del lume, permettono di ottenere conoscenze più dettagliate della popolazione microbica delle prime 7 settimane

La metrite e l'endometrite si verificano comunemente nella bovina da latte dopo il parto. Benché siano stati condotti numerosi studi per identificare i patogeni causali, non ne è stata effettuata una revisione completa. Studi metagenomici hanno analizzato la popolazione batterica dei campioni di lavaggio uterino delle bovine da latte post partum (pp), tuttavia il microbiota del fluido luminale uterino può differire da quello dell'endometrio ed è possibile che importanti possibili patogeni siano stati trascurati.

Uno studio ha confrontato il microbiota del lume uterino e dell'endometrio di bovine sane e affette da endometrite e metrite. Si prelevavano i campioni da 68 bovine da latte Holstein 1, 4 e 7 settimane pp. I dati venivano analizzati mediante sequenziamento profondo delle regioni ipervariabili V1 e V2 dell'rRNA del gene ribosomiale 16S.

I risultati indicano che Porphyromonadaceae, Fusobacteriaceae, Leptotrichiaceae e Mycoplasmataceae possono essere associati alle patologie uterine. I microbiota dei campioni di lavaggio uterino e delle biopsie endometriali erano correlati, tuttavia quelli delle biopsie erano più diversificati.

Fusobacteriaceae e Leptotrichiaceae non venivano osservati nelle biopsie la settimana 7, mentre costituivano rispettivamente il 20% e il 13% delle popolazioni batteriche dei campioni di lavaggio uterino.

La famiglia delle Mycoplasmataceae veniva osservata in quantità molto maggiore nei campioni di lavaggio rispetto alle biopsie endometriali le settimane 4 e 7.

I risultati dello studio supportano le osservazioni di precedenti studi metagenomici e sottolineano l'importanza di includere le biopsie endometriali per ottenere conoscenze più dettagliate del microbiota uterino postpartum, concludono gli autori.

"An investigation of the microbiota in uterine flush samples and endometrial biopsies from dairy cows during the first 7 weeks postpartum." Lif Rodness Vestervy Knudsen, et al. Theriogenology. July 15, 2016. Volume 86, Issue 2, Pages 642-650.

Fattori che influenzano la pubertà nelle manze da carne

Importante la comprensione completa delle modificazioni metaboliche e neuroendocrine necessarie per l'inizio del ciclo estrale

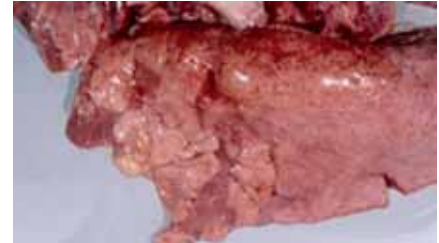
La pubertà è definita come il momento in cui l'ovulazione è accompagnata da segni visibili di estro e successiva normale funzione luteinica. L'età alla pubertà è un fattore importante relativamente al successo riproduttivo, alla durata della vita produttiva e alla redditività nell'industria della carne. Benché la pubertà e l'inizio del normale ciclo estrale siano eventi complessi che richiedono la maturazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaie, è stato ben documentato che la nutrizione, l'età e la genetica sono fattori regolatori dell'età alla pubertà. Tuttavia il loro ruolo è principalmente quello di regolazione della maturazione endocrina che deve avvenire affinché inizi una regolare ciclicità ovarica. L'aumentato tasso di crescita che si verifica tra 4 e 7 mesi è apparentemente sufficiente per indurre la pubertà precoce e tale aumentato tasso di crescita riduce il feedback negativo dell'estradiolo sulla secrezione di LH durante il periodo prepubere.

All'avvicinarsi della pubertà, una progressiva riduzione del feedback negativo dell'estradiolo sulla secrezione di GnRH consente una maggiore frequenza della pulsatilità dell'LH, con conseguente stimolazione della crescita follicolare e aumento della produzione di estradiolo. Inoltre, l'espressione di recettori estrogenici nell'ipotalamo anteriore e nel nucleo ventromediale è negativamente correlata alla frequenza della pulsatilità dell'LH.

Benché un numero significativo di geni e vie siano coinvolti nella neuromaturazione necessaria all'inizio del ciclo estrale normale, gli effetti inibitori del neuropeptide Y sul rilascio di GnRH/LH sembra ridursi e l'effetto stimolante dell'ormone alfa stimolante i melanociti sul GnRH sembra aumentare all'avvicinarsi della pubertà.

È auspicabile quindi una comprensione completa delle modificazioni metaboliche e neuroendocrine che si verificano per l'inizio del normale ciclo estrale al fine di facilitare la gestione della riproduzione, concludono gli autori.

"Factors affecting puberty in replacement beef heifers." G.A. Perry. Theriogenology. July 1, 2016 Volume 86, Issue 1, Pages 373-378.



Mycoplasma hyopneumoniae del suino: dinamiche d'infezione in diversi sistemi produttivi

Il contatto tra animali di età diverse può favorire la trasmissione

Uno studio ha valutato le dinamiche d'infezione di Mycoplasma hyopneumoniae in 66 allevamenti suini con diversi sistemi produttivi (sistemi a 1, 2 o 3 sedi) e ne ha considerato i diversi fattori di rischio. Mediante esame sierologico si identificavano gli anticorpi sierici verso M. hyopneumoniae e si effettuava la RT-PCR per identificare il DNA di M. hyopneumoniae nei tamponi tracheobronchiali.

I risultati dimostravano che l'infezione da M. hyopneumoniae era influenzata principalmente dall'età dell'animale e dal tipo di sistema produttivo.

Il tasso di infezione era maggiore negli animali più anziani e la prevalenza era maggiore nei sistemi a 1 o 2 sedi rispetto a quelli a 3 sedi.

Le dinamiche infettive evidenziate mediante RT-PCR mostravano che le infezioni da M. hyopneumoniae si verificano più precocemente negli allevamenti a 1 sede e si verificano più tardivamente ma si diffondono più rapidamente negli allevamenti a 2 o 3 sedi, suggerendo che il contatto tra animali di età diverse favorisca la trasmissione, concludono gli autori.

"Dynamics of Mycoplasma hyopneumoniae seroconversion and infection in pigs in the three main production systems." Giacomini E, Ferrari N1, Pitozzi A, Remistani M, Giardiello D, Maes D, Alborali GL. Vet Res Commun. 2016 May 4. [Epub ahead of print]

Distribuzione delle lesioni causa di zoppia nel bovino da carne

Localizzate al piede nell'85% circa dei casi.

Solo nel 20% dei casi di natura infettiva, in uno studio

Uno studio retrospettivo ha caratterizzato la prevalenza relativa della diagnosi e la sede delle lesioni di zoppia nei bovini da carne. Si rivedevano le cartelle cliniche degli anni 2005 - 2012 e si identificavano 745 casi di bovini da carne visitati per zoppia.

La causa di zoppia era localizzata al piede nell'85% circa dei casi; era affetto un arto posteriore in più del 70% dei casi. L'unghione laterale era la sede più comunemente affetta nei casi di zoppia sia anteriore sia posteriore. Le cause non infettive più comuni erano gli unghioni a cavatappi, le fissurazioni verticali e i fibromi interdigitali. Le condizioni infettive del



piede costituivano soltanto il 20% delle cause di zoppia podale.

Il pareggio abituale del piede può essere consigliabile in alcune mandrie per migliorare l'equilibrio di appoggio del peso e alleviare i sintomi di zoppia, concludono gli autori.

"Distribution of lameness lesions in beef cattle: A retrospective analysis of 745 cases." Benjamin W Newcomer, Manuel F Chamorro. Can. Vet. J. 2016 Apr; 57(4): 401-6.

Ascessi epatici nei bovini: batteriologia e stato delle misure di controllo

Auspiciabili le alternative agli antibiotici e lo sviluppo di un vaccino

Gli ascessi epatici sono la principale epatopatia riscontrata nei bovini da carne al macello. La loro incidenza è notevolmente variabile ma è compresa generalmente tra il 10 e il 20%. L'incidenza totale e la percentuale di fegati gravemente interessati da ascessi sono maggiori nei bovini Holstein allevati per la produzione di carne e nelle bovine da latte abbattute, rispetto alle razze da carne.

Il motivo della maggiore incidenza di ascessi epatici nei manzi Holstein non è conosciuto ma una delle possibili spiegazioni è il maggior numero di giorni di alimentazione. L'elevata prevalenza nelle bovine abbattute è probabilmente dovuta al fatto che nelle bovine da latte non sono approvati interventi specifici quali l'utilizzo della tilosina nel mangime.

Gli ascessi epatici sono generalmente una conseguenza dell'acidosi ruminale e della ruminita nei bovini nutriti con mangimi ricchi di carboidrati prontamente fermentabili e poveri di crusca; da qui la definizione di complesso "acidosi-ruminita-ascessi epatici". Tali lesioni sono quasi costantemente dovute a infezioni polimi-

crobiche con predominanza di anaerobi gram-negativi.

Quasi tutti gli studi hanno concluso che *Fusobacterium necrophorum*, un batterio ruminale, è l'agente causale primario e *Trueperella* (in precedenza *Arcanobacterium*) *pyogenes* è un patogeno secondario.

Sono stati condotti un numero limitato di studi sulla flora batterica degli ascessi epatici delle bovine da latte abbattute e dei manzi da carne Holstein. Uno studio recente ha descritto l'isolamento di *Salmonella* negli eccessi epatici di bovini Holstein.

Il controllo di queste lesioni nei bovini è basato sull'aggiunta di antibiotici, soprattutto tilosina, nel mangime, associata a una corretta gestione nutrizionale per ridurre la comparsa di acidosi e successiva ruminita.

Benché non vi siano evidenze di sviluppo di resistenza in *F. necrophorum*, il futuro dell'utilizzo della tilosina come additivo nel mangime nei bovini da carne è incerto. Poiché questo antibiotico è ampiamente utilizzato nell'industria da carne, è notevole l'interesse verso alternative agli antibiotici, quali gli oli essenziali e i vaccini, per il controllo degli ascessi epatici. Dato che gli ascessi epatici sono dovuti a infezioni batteriche e i fattori patogeni di virulenza di *F. necrophorum* sono stati studiati ampiamente, sono stati fatti considerevoli sforzi per lo sviluppo di un vaccino efficace. I due antigeni che sono stati individuati per la produzione vaccinale sono la leucotossina e le proteine esterne di membrana di *F. necrophorum*, concludono gli autori.

"Liver abscesses in cattle: A review of incidence in Holsteins and of bacteriology and vaccine approaches to control in feedlot cattle." Amachawadi RG, Nagaraja TG. J Anim Sci. 2016 Apr; 94 (4):1620-32.

Probiotici nel controllo di *Clostridium difficile* del suino

Minore prevalenza di tossina fecale, edema mesocolico e lesioni microscopiche dopo esposizione a *C. difficile* non tossigeno

Benché le infezioni da *Clostridium difficile* (CDI) siano comuni nel suino, sono carenti le strategie preventive. Uno studio ha valutato l'efficacia di *Lactobacillus* spp. e di *C. difficile* non tossigeno (NTCD) nella prevenzione dello sviluppo di CDI nei suinetti.

Si assegnavano a caso i suinetti nati per parto cesareo (N = 150) a 6 gruppi: gruppo 1 - controlli negativi (n = 10); gruppo 2 - solo NTCD (n = 13); gruppo 3 - solo *Lactobacillus* spp. (n = 14); gruppo 4 - controlli positivi (esposti al ceppo tossigeno di *C. difficile*) (n = 35); gruppo 5 - NTCD ed esposizione al ceppo tossigeno di *C. difficile* (n = 34) e gruppo 6 - *Lactobacillus* spp. ed esposizione al ceppo tossigeno di *C. difficile* (n = 44).

I suinetti che ricevevano NTCD mostravano una minore prevalenza di positività fecale alla tossina, di edema mesocolico e di lesioni microscopiche rispetto ai controlli positivi.

La somministrazione di *Lactobacillus* spp. non mostrava benefici evidenti, concludono gli autori.

"Bacterial probiotics as an aid in the control of Clostridium difficile disease in neonatal pigs." Arruda PH et al. Can Vet J. 2016 Feb; 57 (2): 183-8.

Paratuberculosis bovina: importanza dell'igiene del parto

Cruciale per ridurre l'incidenza dei soggetti eliminatori di MAP, in uno studio

Il miglioramento dell'igiene e della gestione della mandria per ridurre il contatto dei vitelli con le feci delle bovine adulte al fine di prevenire nuove infezioni è una delle strategie di base per la gestione delle mandrie da latte affette da paratuberculosis. I programmi di controllo dovrebbero raccomandare una scelta di fattori basati sulle evidenze che riducano chiaramente la trasmissione degli agenti infettivi e la prevalenza di capi infetti, al fine di migliorare l'accettazione e l'implementazione delle misure consigliate tra gli allevatori.

L'effetto di alcune misure gestionali sul successo del controllo dell'infezione è stato valutato in uno studio longitudinale condotto su 28 grosse mandrie da latte con dimensioni medie di 415 bovine.

L'incidenza cumulativa di bovine che eliminavano *Mycobacterium avium* ssp paratuberculosis (MAP) per anno veniva determinata mediante coltura fecale individuale di tutte le bovine durante 5 anni consecutivi.

Utilizzando modelli di regressione multipla, i box da parto separati per le bovine eliminatrici e la disinfezione dei box dopo l'utilizzo venivano identificati come fattori di rischio significativi che riducevano l'incidenza cumulativa di soggetti eliminatori di MAP per anno a livello di mandria.

I risultati forniscono evidenze del fatto che, in aggiunta ad altri fattori, l'igiene del parto e la gestione dei box da parto sono cruciali per il controllo della paratuberculosis, soprattutto nelle grosse mandrie da latte.

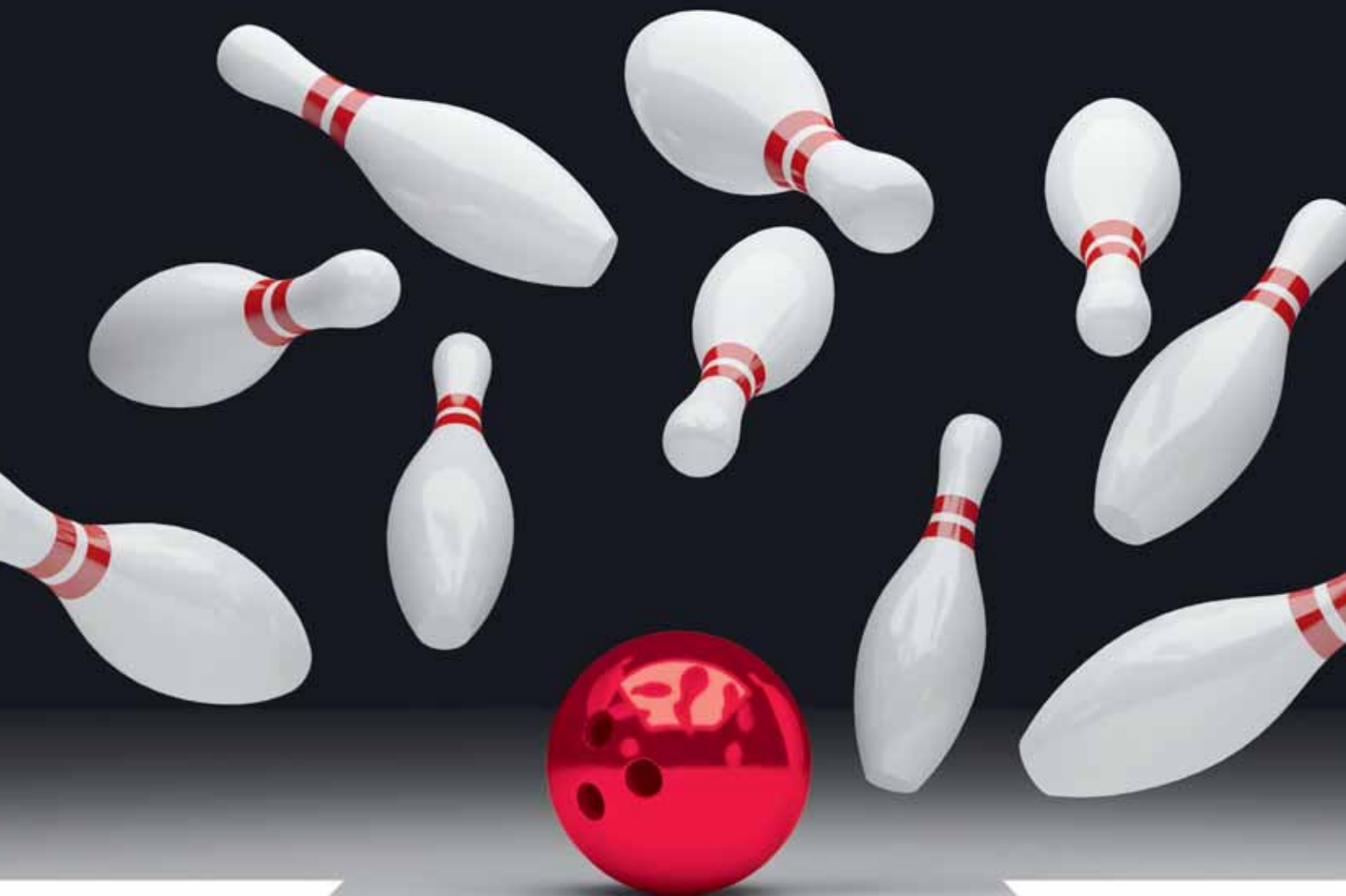
Considerati insieme ai risultati di altri studi, questi risultati possono essere importanti per valutare i diversi fattori di rischio e favorire la collaborazione degli allevatori, concludono gli autori.

"Management of the calving pen is a crucial factor for paratuberculosis control in large dairy herds." Karsten Donat et al. Journal of Dairy Science. May 2016, Volume 99, Issue 5, Pages 3744-3752.



BOEHRINGER

SINDROME RESPIRATORIA DEL SUINO - SRD



ZACTRAN

PER SUINI

Fai strike contro la SRD!

L'ANTIBIOTICO BATTERICIDA ONE-SHOT
PER LA TERAPIA DELLA SINDROME RESPIRATORIA DEL SUINO



MERIAL
A SANOFI COMPANY
www.merial.it