

## STUDIO DELLA POPOLAZIONE MICROBICA RESPONSABILE DELLA CONTAMINAZIONE UTERINA NEL PERIODO PUERPERALE IN BOVINE DA LATTE: DATI PRELIMINARI

Sebastianelli M<sup>1</sup>, Ciullo M<sup>1</sup>, Sebastiani C<sup>1</sup>, Papa P<sup>1</sup>, Crotti S<sup>1</sup>, Fortunati R<sup>2</sup>, Gobbi M<sup>1</sup>, Pezzotti G<sup>1</sup>, Filippini G<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia; <sup>2</sup>Medico Veterinario Libero Professionista

### INTRODUZIONE

La metrite bovina è un'infezione dell'utero che si colloca generalmente dopo il parto ed è riconducibile prevalentemente ad un'infezione batterica. Clinicamente si manifesta con ipertermia, scolo vaginale maleodorante e perdita di tonicità dell'utero. In seguito a metrite si osserva frequentemente un peggioramento delle performances riproduttive dell'animale. Più di 35 specie batteriche sono state isolate dall'utero delle bovine nel periodo puerperale e classificate in 3 categorie sulla base del loro potenziale patogenetico nei confronti dei tessuti uterini: 1) batteri associati a lesioni dell'endometrio uterino, 2) patogeni potenziali ma non comunemente ritenuti responsabili di lesioni uterine, 3) opportunisti e contaminanti non associati ad endometrite. I batteri appartenenti alla prima categoria sono: *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Histophilus somni*, *Prevotella melaninogenica* e *Proteus spp* i quali sono stati associati a grave scolo purulento vaginale, arresto della crescita del follicolo dominante e della produzione di estradiolo e ad un ridotto tasso di concepimento. E' noto inoltre che *T.pyogenes* produce un fattore di crescita per *F. necrophorum* il quale a sua volta produce una leucotossina, mentre *P. melaninogenica* produce una sostanza in grado di inibire la fagocitosi. Presso l'IZSUM nel 2013 è stato avviato un progetto di ricerca per studiare le specie batteriche isolate dall'utero delle bovine da latte nel periodo puerperale con stima semiquantitativa della loro carica. Tali dati verranno in seguito correlati con le manifestazioni cliniche/subcliniche di patologia uterina tramite esame clinico diretto e strumentale.

### MATERIALI E METODI

#### Prelievo

- Prelievo con cytobrush
- Trasporto: Terreno di Stuart sottovuoto
- Analisi: entro 12 ore dal prelievo

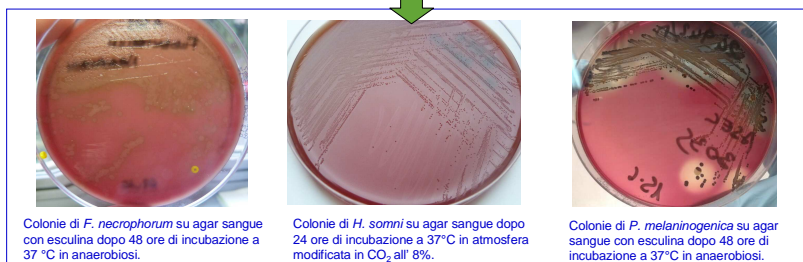


- prelievo su 29 bovine tra 1 e 10 giorni dal parto
- prelievo su 15 delle 29 bovine tra 30 e 40 giorni dal parto



#### Esame batteriologico

- Semina in anaerobiosi : Agar sangue con Esculina in camera da anaerobiosi e incubazione a 37 °C per 48 ore.
- Semina in aerobiosi: 2 piastre di agar sangue, 1 MacConkey agar e 1 Mannitol Salt agar. Una piastra di agar sangue incubata in atmosfera modificata con CO<sub>2</sub> all'8% a 37° C, mentre le altre incubate in atmosfera normale a 37°C ; osservazione dello sviluppo batterico dopo 24 ore.
- Identificazione batteri: caratteristiche delle colonie, colorazione di Gram, morfologia al microscopio ottico, emolisi, pigmentazione, profilo biochimico (API Systems) e altri test standard.
- La crescita dei vari agenti batterici è stata valutata sulla piastra di prima semina con approccio semi-quantitativo considerando ogni quadrante in cui l'ansa veniva strisciata come fattore di diluizione: crescita tal quale sul primo quadrante; titolo di 1:2 se le colonie erano presenti sul secondo; 1:3 sul terzo; 1:4 sul quarto; 1:5 sul quinto.



Colonie di *F. necrophorum* su agar sangue con esculina dopo 48 ore di incubazione a 37 °C in anaerobiosi.

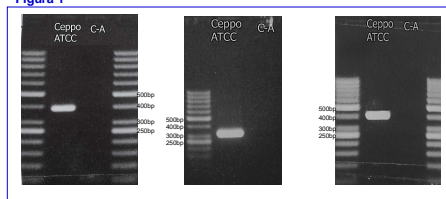
Colonie di *H. somni* su agar sangue dopo 24 ore di incubazione a 37°C in atmosfera modificata in CO<sub>2</sub> all'8%.

Colonie di *P. melaninogenica* su agar sangue con esculina dopo 48 ore di incubazione a 37°C in anaerobiosi.

Tabella1. Primer utilizzati: <sup>1</sup>*P. melaninogenica*; <sup>2</sup>*H. somni*; <sup>3</sup>*F. necrophorum*.

Primers	Sequenza	bp	Gene
<i>phyA</i> 132F <sup>1</sup>	5'-CGTCATGAA GGAGATTGG-3'	389	<i>phyA</i>
<i>phyA</i> 520R	5'-ATAGAACC TCAACGCTC-3'		
HS 453F <sup>2</sup>	5'-GAAAGCGATT AGTTTAAAGAG-3'	313	16S <i>rRNA</i>
HS 765R	5'-ACTCGAGCGT CAGTATCTTC-3'		
<i>lktA-up</i> <sup>3</sup>	5'-ACAATCGGAG TAGTAGGTTTC-3'	402	<i>lktA</i>
<i>lktA-dn</i>	5'-ATTTGTGTAAC TGCCACTGC-3'		

Figura 1



*P. melaninogenica*

*H. somni*

*F. necrophorum*

#### PCR

L'identificazione di *F. necrophorum*, *P. melaninogenica* e *H. somni* è stata eseguita anche mediante PCR (Tabella 1) su ceppi ATCC (Figura 1) e sulle colonie isolate.

### RISULTATI E CONCLUSIONI

#### Risultati Esame Batteriologico in aerobiosi

Batteri Aerobi	Isolamenti (capi infetti) 1-10 gg	Isolamenti (capi infetti) 30-40 gg
<i>T. Pyogenes</i>	9	1
<i>E. coli</i>	21	9
<i>H. somni</i>	2	2
<i>S. dysgalactiae</i>	3	2
<i>S. uberis</i>	2	1
<i>Staphylococci coagulasi negativi</i>	4	1
<i>Streptococci α emolitici</i>	4	3
<i>Proteus spp.</i>	2	0
<i>Streptococcus bovis</i>	0	1

#### Risultati Esame Batteriologico in anaerobiosi

Batteri Anaerobi	Isolamenti (capi infetti) 1-10 gg	Isolamenti (capi infetti) 30-40 gg
<i>P. melaninogenica</i>	10	3
<i>Cl. sordelli tipo 2</i>	6	0
<i>Cl. difficile</i>	1	0
<i>Cl. perfringens</i>	1	0
<i>Cl. acetobutylicum</i>	0	1
<i>Cl. sporogenes</i>	0	1
<i>Peptoniphilus indolicus</i>	2	0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	0

Dall'indagine molecolare risulta che le PCR sono specifiche e la sensibilità è risultata di 1,5x10<sup>5</sup> UFC/ml per *P. melaninogenica*, di 3x10<sup>4</sup> UFC/ml per *F. necrophorum* e di 1,5x10<sup>4</sup> UFC/ml per *H. somni*. Dei 20 ceppi isolati testati in PCR sono risultati positivi: 1 ceppo per *P. melaninogenica* e 2 ceppi per *H. somni*.

La stima semiquantitativa della carica batterica e le specie batteriche isolate verranno correlate nella seconda fase dello studio alla sintomatologia clinica dei soggetti ed ai risultati dell'esame ecografico del lume uterino e dell' endometrio. Le specie batteriche isolate ad oggi nella nostra indagine preliminare, coinvolte in infezioni miste del lume uterino, coincidono con quanto descritto in precedenti studi. Allo stato attuale dei lavori, i risultati mostrano che la varietà delle specie microbiche isolate e la loro carica, molto più variegata ed elevata nell'immediato post-partum (1-10gg) piuttosto che a distanza di 3-4 settimane dal parto, sono concordi con quanto riportato in letteratura.

#### BIBLIOGRAFIA:

- Bennett G, Hickford J, Zhou H, Laporte J, Gibbs J (2009) Detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Dichelobacter nodosus* in lame cattle from dairy farms in New Zealand. *Research in Veterinary Science* 87: 413-415.
- Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ (2010) Risk factors for postpartum uterine disease in dairy cows. *J. Dairy Science* 93:5764-5771.
- LeBlanc SJ (2007) Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *The Veterinary Journal* 176: 102-114.
- McDougall S, Hussein H, Aberdeen D, Buckle K, Roche J, Burke C, Murray M, Meier S (2011) Relationship between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology* 76: 229-240.
- Moustakas VS, Silva TMA, Costa LF, Xavier MN, Carvalho CA Jr., Costa EA, Paixão TA and Santos RL (2013) Species-specific multiplex PCR for the diagnosis of *Brucella* spp., *Actinobacillus* spp., and *Histophilus somni* infection in rams. *BMC Veterinary Research* 9: 51.
- Sheldon IM, Dobson H (2004) Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science* 82-83: 295-306.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO (2006) Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65: 1516-1530.
- Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H (2004) Effect of intrauterine administration of oestradiol on postpartum uterine bacterial infection in cattle. *Animal Reproduction Science* 81: 13-23.
- Yoshida A, Tachibana M, Ansa T, Takehara T (2005) Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of black-pigmented *Prevotella* species in oral specimens. *Oral Microbiol Immunol* 20: 43-46.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM (2005) Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63: 102-117.