

# Zakaźne zapalenie macicy klaczy – problem, którego nie rozwiązała sztuczna inseminacja

Jerzy Kita, Lucjan Witkowski

z Samodzielnej Pracowni Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

Pierwsze doniesienie o nowej, wysoce zaraźliwej chorobie klaczy przebiegającej ze śluzowo-ropnym wypływem z pochwy, skróceniem okresu międzyrurowego i niskim odsetkiem zażrebień pojawiło się w 1977 r. Chorobę opisano u klaczy pełnej krwi angielskiej w Newmarket w Anglii (1, 2). Wprawdzie nieznanym był wówczas czynnik etiologiczny choroby, jednak ze względu na objawy nazwano ją zakaźnym zapaleniem macicy klaczy (*contagious equine metritis* – CEM). Niebawem Taylor i wsp. (3) wyizolowali bakterię, którą nazwali *Haemophilus equigenitalis*. Nazwę tę wkrótce zmieniono na *Taylorella equigenitalis* (4).

Uważa się, że choroba została zawleczona do Anglii przez klacze przywiezione z Irlandii. Rok wcześniej, w 1976 r., te same klacze trafiły do Irlandii z Francji (5). Wkrótce po tym choroba została rozpoznana w Irlandii, we Francji oraz w Australii i Belgii. Mimo wprowadzenia zakazu importu do USA i Kanady koni z Irlandii, Wielkiej Brytanii i Francji, chorobę w 1978 r. stwierdzono w Kentucky (USA). Rok później potwierdzono przypadki choroby w stanie Missouri (USA), a także w Niemczech. W Polsce pierwszy przypadek zakaźnego zapalenia macicy klaczy zdiagnozowano w 2004 r. (6).

## Contagious equine metritis – the health problem unsolved despite artificial insemination

Kita J., Witkowski L., Laboratory of Veterinary Epidemiology and Economics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW

This article presents the current knowledge on contagious equine metritis (CEM). The disease is caused by *Taylorella equigenitalis*. It is highly contagious venereal disease which led to temporary infertility in mare. Infected animals of both sexes are reservoirs of infection. Transmission of *T. equigenitalis* occurs during coitus, with contaminated semen, although it may also be introduced with contaminated instruments. It thus explains why artificial insemination did not solve the problem of CEM yet. The etiology, symptoms, transmission, diagnosis, treatment and control of CEM was broadly discussed in this paper. In the article also the need for constant clinical/laboratory monitoring of stallions and mares before import, during quarantine and before breeding is presented and discussed.

**Keywords:** contagious equine metritis, transmission, monitoring.

*Taylorella equigenitalis*, jest Gram-ujemną pałeczką, względnie beztlenową, niewykazującą ruchu i wolno rosnącą (4, 7). Bakterie przeżywają w mastce i resztkach obumarłych komórek na zewnętrznej powierzchni narządów płciowych ogierów i klaczy (5, 8). Przeżywalność w środowisku zewnętrznym jest stosunkowo krótka ze względu na wrażliwość na światło ultrafioletowe, wysoką temperaturę, obniżoną wilgotność i wiele środków dezynfekcyjnych. Bakteria może natomiast przeżyć na powierzchni sprzętu używanego do pobierania nasienia (4, 9).

Wyróżnia się dwa biotypy szczepów *T. equigenitalis*: streptomycyno-oporne i streptomycyno-wrażliwe. Mogą one wywoływać różnicowane objawy kliniczne (4, 10). Metodami epidemiologii molekularnej wykazano, że istnieje wiele genotypów bakterii, o mniejszym lub większym podobieństwie. W wielu przypadkach wykazano wspólne pochodzenie tych szczepów (10, 11, 12). Na tej podstawie można przypuszczać, że choroba pierwotnie występująca tylko w Europie została rozwleczona wraz z bezobjawowymi nosicielami i nasieniem po całym świecie. Dotychczas brak jednak danych, które umożliwiłyby wykazanie korelacji między genotypem bakterii i objawami klinicznymi (4). Niedawno zsekwencjonowano genom *T. equigenitalis* (11) i dalsze badania być może pozwolą na lepsze zrozumienie molekularnych podstaw przebiegu zakażenia i powstawania odporności, a także dzięki metodom epidemiologii molekularnej ułatwią badania epidemiologiczne (11, 12).

Aktualnie po latach obowiązywania międzynarodowych regulacji (w Polsce choroba podlega obowiązkowi rejestracji) zakaźne zapalenie macicy klaczy występuje w postaci pojedynczych zachorowań; rzadko wybuch choroby dotyczy większej liczby koni. Przypuszcza się jednak, że choroba występuje znacznie częściej niż dotychczas stwierdzano. Podejrzewa się, że najczęstszym źródłem zakażenia są konie z Europy, gdzie dotychczas chorobę potwierdzono przynajmniej w 30 krajach. Zakaźne zapalenie macicy klaczy występuje również w Ameryce Północnej i Ameryce Południowej, Japonii, Australii, Emiratach Arabskich i Afryce Południowej (2, 13, 14, 15, 16).

Zakaźne zapalenie macicy klaczy jest chorobą weneryczną związaną z zakażeniem *T. equigenitalis*, do którego dochodzi podczas naturalnego krycia przez ogiera nosiciela zarazka lub podczas inseminacji nasieniem pochodzącym od ogiera nosiciela. Bezobjawowe nosicielstwo jest główną przyczyną szerzenia się choroby. Następnym zakaźnego zapalenia macicy jest wpływ z pochwy, nieregularne występowanie rui w następstwie niezapłodnienia lub

wczesnego obumarcia zarodka i w związku z tym konieczność ponownego krycia. Wystąpienie choroby niesie za sobą straty ekonomiczne, szczególnie w hodowli koni pełnej krwi (4). Wynikają one z ograniczenia obrotu końmi i utrudnień w rozrodzie. Należy doliczyć także koszty badań diagnostycznych, leczenia i kwarantanny ponoszone przez stadniny, co utrudnia przeliczenie na koszt indywidualnego przypadku. Straty ekonomiczne i hodowlane u innych ras niż pełna krew nie zostały dotychczas oszacowane (13).

Ostatnio coraz częściej opisywane są przypadki zakażenia poziomego niezwiązanego z kryciem ogierami, ale z wprowadzaniem na szerszą skalę unasienniania u innych ras niż pełna krew. Ponadto wykazano, że nasienie przechowywane w ciekłym azocie może być przyczyną rozprzestrzeniania się zakażenia (13). Przypadki te związane są najczęściej z zanieczyszczeniem nasienia podczas jego pobierania lub w trakcie przygotowywania do zamrożenia. Pewien wpływ na szerzenie się choroby mają także centralne ośrodki czy stacje pobierania nasienia i wypożyczanie ogierów jako dawców nasienia. Zagrożenie jest podwójne. Z jednej strony stanowi je nasienie, a z drugiej kontakt bezpośredni i pośredni ogierów, które po powrocie do rodzimych stad czy stadnin mogą przynieść zakażenie (4, 13, 14).

U 30–40% zakażonych klaczy choroba przebiega w postaci ostrego zapalenia macicy będącego wynikiem namnażania się zarazka w błonie śluzowej macicy. Jednak zakażenie zwykle nie ma długofalowych negatywnych skutków. U większości klaczy w ciągu kilku tygodni lub miesięcy dochodzi do samowyleczenia i nie ma problemów z ich zażebieniem. Wykazano także, że ze względu na powstawanie odporności po kolejnej ekspozycji choroba przebiega łagodniej. Niestety, niewielki procent klaczy ozdrowieńców może stać się objawowymi lub, w zdecydowanej większości przypadków, bezobjawowymi nosicielami zarazka (4, 5).

Bakteria wykazuje tropizm do zachyłka i zatok łechtaczki, a tylko czasami do *endometrium* (5). Częstość występowania *T. equigenitalis* w tych miejscach różni się u klaczy z objawami klinicznymi i nosicieli zakażenia. U klaczy chorych w 69% izolowano bakterię z łechtaczki i w 84% z szyjki macicy. Natomiast u nosicieli aż w 93% z łechtaczki i tylko u 31% z szyjki macicy (17). Rozmieszczenie i siewstwo bakterii jest bardzo różnicowane, w związku z tym celem wykrycia nosicieli wymagany jest monitoring bakteriologiczny. W pojedynczych przypadkach opisywano poronienia na tle *T. equigenitalis*. Natomiast zakażenie wewnątrz macicy lub podczas porodu może prowadzić

do wrodzonego pionowego zakażenia źrebęcia. Brak jest danych na temat związku zakaźnego zapalenia macicy z transferem zarodków (4).

W przypadku ogierów trudno jest mówić o zakażeniu *T. equigenitalis*, skoro drobnoustroj ten często występuje w pre-dylekcyjnych miejscach, jak cewka moczowa, zachyłek zatoki cewki oraz błaszka zewnętrzna napletka, nie wywołując stymulacji immunologicznej i objawów klinicznych. Ogiery zakażone lub nosiciele, u których nosicielstwo trwa wiele miesięcy, a nawet lat, stanowią główne źródło zakażenia. Transmisja zakażenia następuje podczas krycia klaczy lub unasienniania zanieczyszczonym nasieniem (4, 5). Przyjmuje się jednak, że większe ryzyko zakażenia jest przy naturalnym kryciu niż przy inseminacji nasieniem mroźnym. Wpływ na szerzenie się choroby ma także liczba bakterii u ogiera oraz podatność klaczy na zakażenie związana z odpornością miejscową (18).

W 1997 r. w USA wyizolowano od osłów nowy gatunek *Taylorella asinigenitalis* (19). Dotychczas bakterię stwierdzono w Szwecji, Francji i we Włoszech (20,21). Czynniki ryzyka i drogi szerzenia się są podobne do *T. equigenitalis* u koni. Brak jest jednak informacji na temat rozpowszechnienia tego zakażenia oraz zagrożenia dla koni. Doświadczalnie udało się zakazić klacz szczepem Kentucky, ale nie Kalifornia *T. asinigenitalis*. Jednak w warunkach naturalnych klacze narażone na zakażenie od osłów nie chorowały (22).

Badanie bakteriologiczne pozostaje złotym standardem w diagnostyce zakażenia. Jest wymagane w diagnostyce w międzynarodowym i krajowym obrocie końmi (5). W Polsce ogiery przed dopuszczeniem do rozrodu, zgodnie z obowiązującymi przepisami, muszą spełnić szereg wymagań. Do dopuszczenia ogiera do krycia w punkcie kopolacyjnym nie jest jednak wymagane badanie w kierunku nosicielstwa *Taylorella equigenitalis*. W niektórych ośrodkach hodowlanych stosowane są jednak takie wymagania dotyczące ogierów będących dawcami nasienia. Konie te muszą być dodatkowo przebadane w kierunku *Taylorella equigenitalis* z wynikiem ujemnym. Badanie to obejmuje trzykrotne, w odstępie 7 dni, pobranie wymazów z napletka, cewki moczowej, dołu cewki moczowej oraz dodatkowo płynu przed ejakulacyjnego.

Wymazy, pobrane na odpowiednie podłoże transportowe i przechowywane w temperaturze 4–6°C, powinny być dostarczone w ciągu 48 godzin do laboratorium w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym w Puławach. Izolacja wymaga podłoża wybiórczo-namnażających i około tygodnia inkubacji (ryc. 1). Pomimo znacznego postępu metod diagnostycznych,



zdarzają się dość często wyniki fałszywie ujemne. Przyczyną jest często niewielka liczba *T. equigenitalis* w badanej próbce oraz jej wymagania wzrostowe i powolny wzrost na podłożach oraz liczna flora saprofityczna rosnąca na pożywkach, pomimo dodatków hamujących (5, 8). Czasem pojawiają się komplikacje związane ze wzrostem podobnych morfologicznie kolonii *T. asinigenitalis* (23).

Diagnostyka serologiczna nie ma zastosowania w praktyce. Odczyn wiązania dopełniacza (OWD) pozwala na wykrycie serokonwersji u klaczy z postacią ostrą choroby, jednak zgodność z badaniem bakteriologicznym jest niska, co wykazały badania w trakcie wybuchu choroby w USA w latach 2008–2009. Ponadto badanie serologiczne nie pozwala na wykrycie klaczy nosicielek, a u ogierów, ze względu na bardzo niskie miana przeciwciał, nie ma żadnego zastosowania (3, 5, 16).

Obiecujące wydaje się zastosowanie metod biologii molekularnej. Opracowane testy real-time PCR są nie tylko wysoce czułe i swoiste, ale umożliwiają również wykazanie obecności bakterii pomimo wzrostu flory saprofitycznej. Zdecydowanie ułatwia to rozpoznawanie choroby, zwłaszcza w przypadku zanieczyszczenia próbki lub długotrwałego transportu do laboratorium w wyższej temperaturze. Dodatkowo umożliwiają nie tylko wykonanie badania bezpośrednio z wymazu, ale także odróżnienie *T. equigenitalis* od *T. asinigenitalis*, przy czym jest to metoda dużo szybsza i tańsza od tradycyjnej izolacji (10, 11, 16, 18, 24).

W przypadku otrzymania wyniku dodatniego wskazane jest miejscowe stosowanie środków dezynfekujących i antybiotyków oraz antybiotykoterapia ogólna. Leczenie jest w pełni skuteczne zarówno u klaczy, jak i ogierów. Pomimo rozróżniania szczepów *T. equigenitalis* w oparciu na wrażliwość na streptomycynę, bakteria jest wrażliwa na większość powszechnie stosowanych antybiotyków, jak: penicyliny, ampicyliny, tetracykliny czy sulfonamidów z trimetoprimem. U zakażonych klaczy zalecane jest codzienne przemywanie zatok i dołu łechtaczki, a u ogierów prącia (najlepiej we wzwodzie) środkami keratolitycznymi i 4% roztworem chlorheksydy lub 0,2% roztworem nitrofurantoiny, a następnie zastosowanie tego leku w maści. W większości przypadków wystarczające są 4–5 dni leczenia, ale czasem konieczne jest jego przedłużenie nawet 10 dni. W pojedynczych przypadkach postępowanie to bywa nieskuteczne. W takich sytuacjach sprawdza się 1% maść z sulfadiazynianem srebra. Sporadycznie konieczne jest zastosowanie antybiotykoterapii miejscowej, jak i ogólnej, w oparciu o antybiogram. Dopiero po 21 dniach od



Ryc. 1. Kolonie *Taylorella equigenitalis* na agarze czekoladowym (dzięki uprzejmości prof. Petera J. Timoney'a z Gluck Equine Research Center, Lexington, Kentucky, USA)

zakończenia leczenia należy przeprowadzić badanie diagnostyczne (5, 9, 16, 24, 25).

Według danych Animal Health Trust ([www.aht.org.uk](http://www.aht.org.uk)) w latach 2000–2012 zanotowano 146 przypadków zakaźnego zapalenia macicy klaczy w 12 krajach, w tym: w USA, Republice Południowej Afryki i Wielkiej Brytanii. Większość ognisk stwierdzono u koni innych ras niż pełna krew i wykazano ich związek z inseminacją. W Wielkiej Brytanii w latach 2005–2009 stwierdzano sporadycznie zakaźne zapalenie macicy klaczy u innych ras niż pełna krew. Były to głównie konie przewożone do innych krajów. Ostatnio opisano także przypadek zakażenia u klaczy pełnej krwi niewykazującej objawów chorobowych w trakcie rutynowego badania wymazów z łechtaczki przed kolejnym zapłodnieniem. W USA, w latach 2008–2010, stwierdzono chorobę u koni 12 różnych ras w ośmiu stanach. Było to powodem wdrożenia rutynowych badań na szeroką skalę (5, 14, 15, 16). Najprawdopodobniej źródłem zakażenia był ogier rasy fjord, importowany z Danii w 2000 r. Ogier ten przebywał w stacji unasienniania i w bliżej nieokreślony sposób zakażył 22 inne ogiery. Z zebranych informacji wynikało, że wszystkie miały pobierane nasienie w tym samym dniu (16). Co ciekawe, wspomniany ogier przeszedł pozytywnie badania zarówno przed wysyłką, jak i w trakcie kwarantanny i był leczony. Po czym jako zdrowy został wwieziony do USA, gdzie zaraził

kilkadziesiąt koni. Być może było to wynikiem błędów przy pobieraniu próbek lub nieskutecznego leczenia albo niskiej czułości testów diagnostycznych. Dalsze szerzenie się choroby nie nastąpiło drogą krycia, ale poprzez sprzęt i wyposażenie używane w stacji unasienniania, jak np. fantom, sztuczna pochwa (16). W 2011 r. po raz pierwszy chorobę opisano w Republice Południowej Afryki. Źródłem zakażenia był ogier importowany z Europy. Badania wykazały ponadto nosicielstwo zarazka u dwóch ogierów i jednej klaczy inseminowanej zakażonym nasieniem. Wszystkie te przypadki pochodziły z jednego centrum inseminacji. Wykazano szerzenie się zakażenia wśród ogierów drogą pośrednią (poprzez sprzęt), nawet u tych, które nigdy nie kryły i nie pobierano od nich nasienia (26, 27).

W Polsce w latach 2007–2009 przebadano 83 klacze i 129 ogierów z ośrodków hodowlanych, w których prowadzony jest rozród koni w oparciu o krycie i inseminację. U dwóch ogierów (0,9%) pochodzących z różnych ośrodków wykazano obecność *T. equigenitalis*. Tygodniowe leczenie, polegające na codziennym przemywaniu dołu żołądki i zatoki cewki moczowej oraz powierzchni prącia i napletka 2% roztworem chlorheksydy, a następnie zastosowanie 0,2% maści nitrofurantoiny połączone z iniekcyjnym podawaniem penicyliny i streptomycyny, okazało się w pełni skuteczne (6). Pojawiają się

także pojedyncze, niepublikowane informacje od lekarzy i hodowców o zdarzających się przypadkach nosicielstwa u ogierów. Jedną z takich informacji dotyczyła dwóch bardzo młodych koni, nigdy nieużywanych do rozrodu. Świadczy to o obecności zarazka w populacji koni i potwierdza konieczność ciągłej kontroli klaczy i ogierów, a także brania pod uwagę zakażenia *T. equigenitalis* w diagnostyce przypadków *endometritis* i jałowoci u klaczy.

## Piśmiennictwo

- Crowhurst R.C.: Genital infection in mares. *Vet. Rec.* 1977, **100**, 476.
- Timoney P.J., Ward J., Kelly P.: A contagious genital infection of mares. *Vet. Rec.* 1977, **101**, 103.
- Taylor C.E., Rosenthal R.O., Brown D.F., Lapage S.P., Hill L.R., Legros R.M.: The causative organism of *contagious equine metritis* 1977: Proposed for a new species to be known as *Haemophilus equigenitalis*. *Equine Vet. J.* 1978, **10**, 136–144.
- Timoney P.J.: *Contagious equine metritis*: an insidious threat to the horse breeding industry in the United States. *J. Anim. Sci.* 2011, **89**, 1553–1560.
- Luddy S. L., Kutzler M. A.: *Contagious equine metritis* within the United States: a review of the 2008 outbreak. *J. Equine Vet. Sci.* 2010, **30**, 393–400.
- Zbylut J., Malinowski E.: Sytuacja epizootyczna zakaźnego zapalenia macicy klaczy w wybranych ośrodkach hodowli koni w Polsce. *Med. Weter.* 2010, **66**, 559–561.
- Malicki K., Binek M.(red.): *Zarys klinicznej bakteriologii weterynaryjnej*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2004.
- Ousey J. C., Palmer L., Cash R. S. C., Grimes K. J., Fletcher A. P., Barrelet A., Foote A.K., Manning F. P., Ricketts S.W.: An investigation into the suitability of a commercial real-time PCR assay to screen for *Taylorella equigenitalis* in routine prebreeding equine genital swabs. *Equine Vet. J.* 2009, **41**, 878–882.
- Timoney P.J., Powell D.G.: *Contagious equine metritis* epidemiology and control. *J. Equine Vet. Sci.* 1988, **8**, 42–46.
- Matsuda M., Moore J. M.: Recent advances in molecular epidemiology and detection of *Taylorella equigenitalis* associated with *contagious equine metritis* (CEM). *Vet. Microbiol.* 2003, **97**, 111–122.
- Herbert J., Moumen B., Pons N., Duquesne F., Breull M.F., Coux D., Batto J.M., Renault F., Perry S.: Genomic sequence of *Taylorella equigenitalis* MCE9, the causative agent of *contagious equine metritis*. *J. Bacteriol.* 2011, **193**, 1785.
- Hauser H., Richter D.C., van Tonder A., Clark I., Preston A.: Comparative genomic analyses of the *Taylorellae*. *Vet. Microbiol.* 2012, **159**, 195–203.
- Timoney P. J.: Infectious diseases and the international movement of horses. W: Sellon D.C., Long M. T. (edit.): *Equine Infectious Diseases*. Saunders, St. Louis 2007, s. 549–505.
- Ricketts S.W., Crouhurst J., Newton B., Gibbens N.: *Contagious equine metritis* organism confirmed in Gloucestershire. *Vet. Rec.* 2012, **170**, 398.
- May C.E., Schulman M.L., Gerstenberg C., Grobler A., Mphole A., Guthrie A.J.: Co information of the first outbreak of contagious equine metritis in South Africa. W: Squires E.I., Orsini J.A., Evans J. (edit.). 9<sup>th</sup> International Conference in Equine Infectious Diseases. *Equine Vet. Sci.* 2012, **32**, 77.
- Erdman M.A., Creekmore L.H., Fox P.E., Pelzel A.M., Porter-Spalding B.A., Aalsburg A.M., Cox I.K., Morningstar-Shaw B.B., Crom R.L.: Diagnostic and epidemiologic analysis of the 2008–2010 investigation of a multi-year outbreak of contagious equine metritis in the United States. *Prev. Vet. Med.* 2011, **101**, 219–228.
- Wood J. I.N., Kelly L., Cardwell J. M., Park A.W.: Quantitative assessment of the risk of reducing the routine swabbing requirements for the detection of *Taylorella equigenitalis*. *Vet. Rec.* 2005, **157**, 41–46.
- Klein C., Donahue J.M., Sells S. F., Squires E. I., Timoney P.J., Troedson M.H.T.: Effect of antimicrobial containing semen extender on risk of dissemination of contagious equine metritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2012, **241**, 910–921.
- Jang S.S., Donajue J.M., Arata A.B., Goris J., Hansen L.M., Earley D.L., Vandamme P.A., Timoney P.J., Hirsh D.C.: *Taylorella asinigenitalis*, sp. nov., a bacterium isolated from the genital tract of male donkeys (*Equus asinus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001, **51**, 971–976.
- Baverud V., Nystrom C., Johansson K.E.: Isolation and identification of *Taylorella asinigenitalis* from the genital tract of a stallion, first case of a natural infection. *Vet. Microbiol.* 2006, **116**, 294–300.
- Franco A., Donati V., Troiano P.: Detection of *Taylorella asinigenitalis* in donkey jacks in Italy. *Vet. Rec.* 2009, **165**, 540–541.
- Meade B.J., Timoney P.J., Donahue J.M., Branscum A.J., Ford R., Rowe R.: Initial occurrence of *Taylorella asinigenitalis* and its detection in nurse mares, a stallion and donkeys in Kentucky. *Prev. Vet. Med.* 2010, **95**, 292–296.
- Duquesne F., Pronost S., Laugier C., Petry S.: Identification of *Taylorella equigenitalis* responsible for contagious equine metritis in equine genital swabs by direct polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.* 2007, **82**, 47–49.
- Anzal T., Kamada M., Niwa H., Eguchi M., Nishi H.: Contagious equine metritis eradicated from Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2011, **74**, 519–522.
- Timoney P. J.: Contagious equine metritis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1996, **19**, 194–204.
- Schulman M. L., May C.E., Keys B., Guthrie A.J.: Contagious equine metritis: Artificial reproduction changes the epidemiological paradigm. *Vet. Microbiol.* 2013, **167**, 2–8.
- Schulman M.L., May C.E., Joone C., Moyai M., Gerstenberg C., Naidon R., Plenaar J., Guthrie A. J.: A PCR - based screening program to assess the prevalence of *Taylorella equigenitalis* in breeding stallions in South Africa. W: Squires, E.I., Orsini, J.A., Evans J. (edit.): 9<sup>th</sup> International Conference on Equine Infectious Disease. *Equine Vet. Sci.* 2012, **72**, 32.