

LAR



Large Animal Review

ISSN: 1124-4593

05/19

LARGE ANIMAL REVIEW is ranked in Citation Index (SciSearch®)
Journal Citation Reports/Science Edition and CAB ABSTRACTS

ORIGINAL ARTICLES

BOVINE

- Hyaluronidase, with xylazine and ketamine, reducing immobilization time in wild cattle (*Bos Taurus*)
- Association assessment of single nucleotide polymorphism in Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like (*FEZL*) gene with mastitis susceptibility in Holstein cattle

CAPRINE

- Investigation of the relationship between kids vitality and placental characteristics in hair goats

EQUINE

- Preliminary results on antifungal activity of donkey milk

POULTRY

- Pseudotuberculosis aviare in tacchini di allevamento rurale della provincia di Chieti, Italia

REVIEWS

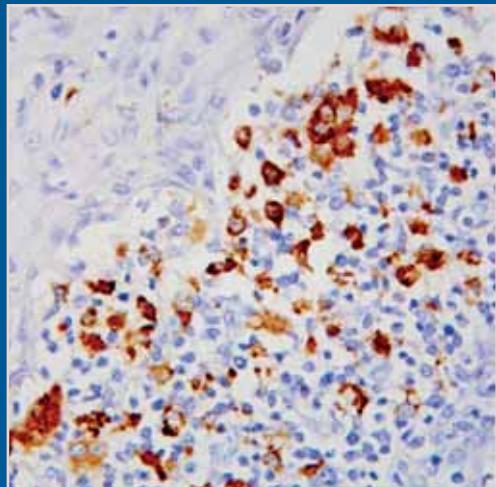
SWINE

- Interazione tra PCV2 e sistema immunitario. Cosa è cambiato dopo l'introduzione della profilassi vaccinale

CASE REPORTS

BOVINE

- Intossicazione da doxiciclina in vitelli di razza Frisona Italiana: descrizione clinica e indagini anatomo-patologiche





BOVILIS

Bovilis® IBR Marker Live

BOVILIS

Bovilis® Bovipast RSP

BOVILIS

Bovilis® IBR Marker Inac

BOVILIS

Bovilis® BVD

BOVILIS

Ringvac Bovilis®

Rotavec Corona

BRAVOXIN¹⁰



Anno 25, numero 5,
Ottobre 2019

Rivista indicizzata su:
CAB ABSTRACTS e GLOBAL HEALTH
IF (2017/2018): 0.26

Editor in chief: Massimo Morgante

Editorial Board 2019-2021:
Anna Rita Attili - Roberto Bardini
Francesca Bonelli - Marta Brscic
Marco Colombo - Vincenzo Cuteri
Antonella Dalle Zotte - Enrico Fiore
Giovanni Franzo - Matteo Ganesella
Elisabetta Giudice - Paolo Moroni
Davide Ranucci - Antonia Ricci
Giuseppe Stradaioli - Erminio Trevisi

Managing Editor: Matteo Ganesella

Technical Editor: Enrico Fiore

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 2017-2019

Daniele Gallo (Presidente)
Giacomo Tolasi (Vice-Presidente)
Luigino Tondello (Segretario)
Mario Facchi (Tesoriere)
Alberto Ferrero (Consigliere)
Osvaldo Parolin (Consigliere)
Chiara Musella (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 Abbiategrasso (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: 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.

INDEX

ORIGINAL ARTICLES



BOVINE

Hyaluronidase, with xylazine and ketamine, reducing immobilization time in wild cattle (*Bos taurus*)

FILIPPO SPADOLA, GIOVANNA COSTA,
CLAUDIA INTERLANDI, MARCELLO MUSICÒ

159

Association assessment of single nucleotide polymorphism in Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like (FEZL) gene with mastitis susceptibility in Holstein cattle (*Bos taurus*)

GHADA E. ALI, MARWA A. IBRAHIM, SAID M. ZAKI

163



CAPRINE

Investigation of the relationship between kids vitality and placental characteristics in hair goats

SELCUK OZYUREK

173



EQUINE

Preliminary results on antifungal activity of donkey milk

IOLANDA ALTMONTE, SIMONA NARDONI,
FRANCESCA MANCIANTI, STEFANIA PERRUCCI,
ROSARIO LICITRA, FEDERICA SALARI, MINA MARTINI

179



POULTRY

Pseudotuberculosis aviare in tacchini di un allevamento rurale della provincia di Chieti, Italia

ELGA ERSILIA TIERI, MARIA ANTONIETTA SALETTI,
ALESSANDRA CORNACCHIA, GABRIELLA DI FRANCESCO,
ANNA RITA D'ANGELO

183



SWINE

Interazione tra PCV2 e sistema immunitario. Cosa è cambiato dopo l'introduzione della profilassi vaccinale

GIULIA D'ANNUNZIO, FABIO OSTANELLO,
GIUSEPPE SARLI

187

REVIEWS



BOVINE

Intossicazione da doxiciclina in vitelli di razza Frisona Italiana: descrizione clinica e indagini anatomo-patologiche

ELEONORA COPPOLETTA, EDOARDO TUCCIA,
EMANUELE INVERNIZZI, PIETRO RICCABONI

201

CASE REPORTS

SAVE the DATE



22° CONGRESSO INTERNAZIONALE SIVAR



13-15 Maggio 2020
Cremona, Palazzo Trecchi



Hyaluronidase, with xylazine and ketamine, reducing immobilization time in wild cattle (*Bos taurus*)



FILIPPO SPADOLA¹, GIOVANNA COSTA¹, CLAUDIA INTERLANDI¹, MARCELLO MUSICÒ¹

¹ Department of Veterinary Sciences, University of Messina, Italy

SUMMARY

Aim - To evaluate the effects of the addition of hyaluronidase to xylazine and ketamine drug combination on chemical immobilization times in wild cattle.

Study design - Trial study, “blinded” randomized.

Animals - Forty free wild cattle (*Bos taurus*).

Methods - Cattle were divided into two groups and immobilized using chemical immobilization, in group A has been administered an association of 0.4 mg/kg xylazine and ketamine hydrochloride 1 mg/kg, in the group B the same dosage combination of ketamine and xylazine is added 300 UI of hyaluronidase. The time spent between first pharmacological effects and the return at the quadrupedal station (T¹-T⁶), heart rate, respiratory rate and body temperature were monitored.

Results - In group B, all monitored times were significantly shorter than in group A, exception made for time T⁵.

The total time (T⁶) between inoculation of the drug at the return of quadrupedal station was shorter in group B [53 (35/70)] than in group A [72 (7/79)], P = 0.000.

Conclusion and clinical relevance - The use of hyaluronidase, in association with xylazine/ketamine, shortens the chemical immobilization time in wild cattle.

KEY WORDS

Cattle; hyaluronidase; xylazine; ketamine; anesthesia.

INTRODUCTION

A growing number of beef cattle farms in southern Italy are specialized in free range or semi-free range breeding. Free animals are often subject to injuries and stress when handled, and sedation is necessary for medical examinations, sampling, diagnostic examinations, tests, vaccinations, antiparasitic treatments, surgical operations, and dental care. Chemical immobilization is proven to be the most effective method for sedating free bovines and other ruminants.⁵⁻⁶

Once the animal is hit by the dart however, could escape and reach places far and hard to reach before there are the effects of sedation. We tested the use of immediate-action molecules to shorten the chemical immobilization time, adding hyaluronidase to the anesthesia blend.

Hyaluronidase is a hydrolyzing enzyme with effects on hyaluronic acid, which is a mucopolysaccharide that constitutes the essential element of the connective tissue. Hyaluronidase depolymerizes the complex molecule of hyaluronic acid, reducing its natural viscosity and, consequently, increases the permeability of the tissues for a period of 24-48 hours, necessary for the synthesis of new hyaluronic acid.^{1,8,13}

The enzyme is considered a “spreading factor” because enhances the diffusion capacity and bioavailability of injected drugs. Therefore, the enzyme has been used as a local adjuvant to increase the diffusion capacity of local anesthetics,

indeed hyaluronidase may increase the tissue penetrating area of the local anesthetic by up to 40%.^{2,12,13} The duration of local anesthesia is usually reduced by concomitant administration of hyaluronidase; the association with adrenaline however counteracts the action of hyaluronidase.^{1,2,12} According some authors hyaluronidase enhances the effect of procaine, but not that of lidocaine or mepivacaine. Hyaluronidase is a useful local anesthetic for the retrobulbar ocular area, it reduces the intraorbital pressure, improving the speed and the quality of the peribulbar block.¹² The use of hyaluronidase has been described as facilitating chemical immobilization in the African buffalo, the gnu, the moose, the polar bear, the giraffe, the rhinoceros and in the African elephant.^{9,11} In all these animals the use of hyaluronidase in combination with analgesics or sedatives reduces the time before onset of immobilization. Other authors obtained different results in the horses (*Equus caballus*) because there not found difference between the group sedated with anesthetics alone compared to the group sedated with anesthetics and hyaluronidase.¹⁸

The purpose of this study is to evaluate the effect of hyaluronidase, administered together with ketamine and xylazine, on the induction time in wild cattle using chemical immobilization. Our hypothesis is that hyaluronidase may facilitate the absorption of the anesthetic from the injection site, making induction time shorter.¹⁹

MATERIAL AND METHODS

The study was approved by the University of Messina Review Board for Animals Care (protocol number 032/2019). The

Corresponding Author:
Claudia Interlandi (cinterlandi@unime.it).

trials were performed according to the Italian law (DM 116192), the European laws (OJ of L L 358/1, 12/18/1986), and US Animal Welfare Assurance No A5594-01, (Department of Health and Human Services, USA). All owners of the tested animals gave their informed consent.

The experiment was conducted on a group of 40 free wild cattle. Mean age of the subjects ranged between 9 and 36 months, and their weight between 200 and 500 kg. The animals were divided into two groups: group A included 20 subjects, mean age 17.72 ± 7.9 months and estimated weight 332.96 ± 58 kg, group B included 20 subjects, mean age 18.10 ± 7.8 months and average weight 336.20 ± 86 kg. All cattle were nervous and did not allow any approach. Subjects were medium and small cross-breed individuals.

The anesthetics protocols were randomized by lottery: in group A were administered 0.4 mg/kg xylazine 20% (Rompun® Dry Substance, Bayer S.p.a.) and ketamine hydrochloride 10% (Ketavet® MSD Animal Health S.r.l.) 1 mg/kg. In group B the same drugs and dosages were used but with the addition of 300 IU of hyaluronidase. (Jaluran®, Pfizer Italy S.r.l.).

Chemical immobilization was performed from a distance of between 12 and 20 meters. We used syringes (1.5 ml) armed with hypodermic needles 2.0 x 30 mm and syringes (5 ml) armed with hypodermic needles 2.0 x 40 mm.

The manifestation of the first pharmacological effects were hypersalivation, slowness of movement and lowering of the head of the animals. When sedation was obtained and the cows reach recumbency, were left quiet for about 15 minutes. Their eyes were protected with a moistened bandage to prevent corneal dehydration following the anesthesia, all animals were monitored for two hours for possible signs of metoerism (as it had been impossible to establish a fasting period before the procedure, ruminal atonia was a risk), none drug were used like reversal agent.

Cattle were subjected to blood sampling, marking and antiparasitical treatment.

We have not see cutaneous dart reactions, from chemical immobilization, in the subjects.

The monitored times are: Time 1 (T¹), time between the shot and the first signs of pharmacological effect; Time 2 (T²), time from the first signs of the pharmacological effect to the recumbency; Time 3 (T³), the time from recumbency to a plane of deep anesthesia; Time 4 (T⁴), time between anesthesia and the first signs of revival; Time 5 (T⁵), time from first signs of revival to the quadrupedal station; Time 6 (T⁶), total time: from chemical immobilization to quadrupedal station. Statistical analysis of the data was performed using SPSS 15.0

IBM software for Windows. Shapiro-Wilk normality test was performed, the data are expressed with median and range, differences between groups were compared using the Mann-Whitney U test, p<0.05.

RESULTS

Shapiro-Wilk normality Test, highlighted that the data were not normally distributed.

In group A 5(4/6), T¹ time between inoculation of the anesthetic mixture and the first signs of the pharmacological effect were double than in group B 2(1/4) (P = 0.000).

T² time, between the first signs of the pharmacological effect and the loss of the quadrupedal station, were very higher in group A 7.32 (4/10) than in B 3 (1/5), P = 0.000.

The time from recumbency to a plane of deep anesthesia (T³) was of 38.50 (28/58) in group A and 32 (24/54) in group B, P = 0.026.

Also, T⁴, time between anesthesia and the first signs of revival are greater than group A 38.50 (28/58) with respect to B 32 (24/54). P = 0.026.

Only, in group T⁵, the times from first signs of revival to the quadrupedal station no showed differences statistically significant P = 0.685. Total time (T⁶) from chemical immobilization to quadrupedal station was shorter in group B 53 (35/70) than in group A 72 (7/79). P = 0.000.

DISCUSSION

The mechanism of action of hyaluronidase is not fully known, this enzyme is believed to enhance the interstitial permeability through the disruption of the β-1,4-glycosidic bond between the 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose and the D-glucuronic acid. The action of this enzyme is quickly reversible.¹⁶ To try to standardize the subjects we tried to divide them in to two groups, evaluating approximately weight and age, this in order to obtain reliable data.

Obtained data show like, in group B respect group A, there are significant difference in all the monitoring moments.

Our results validate our hypothesis that the addition of hyaluronidase to the anesthetic blend accelerates the diffusion of the anesthetic compound and therefore the effects of the drugs.

This results are similar to those reported in the literature, however other authors used etorphine in association with azaperone, xylazine or alone.^{7,11,14}

Table 1 - Time after ketamine/xylazine (A group) and ketamine/xylazine/ialuronidase (B group) administered intramuscularly.

Legend: T1 Time between inoculation of the anesthetic mixture and the first signs of the pharmacological effect; T2 time between the first signs of the pharmacological effect and the loss of the quadrupedal station; T3 time between the achievement of recumbency and deep anesthetic state; T4 time between anaesthesia and the first signs of revival; T5 Time between the first signs of revival and quadrupedalism resumption; T6 Total time: by inoculation of the drug at quadrupedalism resumption. Data were expressed with median and range.

Groups	Time (minutes)					
	T1	T2	T3	T4	T5	T6
A	5 (4/6)	7.32 (4/10)	9.75 (9/12)	38.50 (28/58)	7 (5/15)	72 (7/79)
B	2 (1/4)	3 (1/5)	6 (4/8)	32 (24/54)	7.5 (5/15)	53 (35/70)
pVALUE	0.000	0.000	0.000	0,026	0,685	0.000

The anesthetized subjects reached a good degree of muscular relaxation, favouring all maulinity.

Decreasing the time of decubitus reduces the possibility of complications such as ruminal atonia, circulatory disorders or respiratory problems.

The use of hyaluronidase is advisable in the chemical immobilization of free cattle and ruminants in general. This enzyme reduces the induction time, accelerates the achievement of recumbency and therefore facilitates patient management.^{5-7,11,14}

This protocol could be particularly useful when used in wild animals caught in stressful conditions.

In effect several authors have noted how the stress, in cattle and other ruminants as the fallow deer, determined a prolonged induction time and a greater demand for alpha2-adrenoceptors.^{5,6,17}

Based on our findings in other species the results of our study could change due to climatic differences, then, given same conditions of drugs protocols and species, there could be different responses in winter or summer.¹ Moreover, there could be some difficulties in estimating the real weight of the animals, given the huge dimensions of the individuals.

References

- Bisetto SP, Carregaro AB, Nicolai AES, Bressan TF, Leal WP, Xavier NV, Leal DF, Andrade AFC. (2017) Hyaluronidase administered with xylazine-tiletamine-zolazepam into adipose tissue shortens recovery from anesthesia in pigs. *Vet Anaesth Analg.*; 44: 594-599.
- Buhren BA, Schrumpf H, Hoff NP, Bölke E, Hilton S, Gerber PA. (2016) Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *Eur J Med Res.*; 21; 5.
- Bush M, Grobler DG, Raath JP. (2002) The Art and Science of Giraffe (*Giraffa camelopardalis*) immobilization/anesthesia. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. In: Zoological Restraint and Anesthesia, D. Heard (eds); pp 1-6.
- Cattet MRL, Obbard ME. (2010) Use of Hyaluronidase to Improve Chemical Immobilization of Free-ranging Polar Bears (*Ursus maritimus*). *Journal of Wildlife Diseases*; 46: 246-250.
- Costa GL, Nastasi B, Musicò M, Spadola F, Morici M, Cucinotta G, Interlandi C. (2017a) Influence of ambient temperature and confinement on the chemical immobilization of fallow deer (*Dama dama*). *J Wildl Dis.* 53: 364-367.
- Costa GL, Nastasi B, Musicò M, Spadola F, Morici M, Cucinotta G, Interlandi C. (2017b) Reply to Arnemo and Kreeger: Influence of Ambient Temperature and Confinement on the Chemical Immobilization of Fallow Deer. *J Wildl Dis.* 53: 701-702.
- Dittbner JM, Venter L, Naidoo V. (2015) Accelerated induction of etorphine immobilization in blue wildebeest (*Connochaetes taurinus*) by the addition of hyaluronidase. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia.* 42:173-177.
- Girish KS, Kemparaju K. (2007) The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 80:1921-43.
- Haigh JC. (1979) Hyaluronidase as an adjunct in an immobilizing mixture for Moose. *J Amer Vet Med Assoc.* 175: 916-917.
- Kock MD. (1992) Use of hyaluronidase and increased etorphine (M99) doses to improve induction times and reduce capture-related stress in the chemical immobilization of the free-ranging black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in Zimbabwe. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* 23:181-188.
- Lance WR. (2008) Exotic hoof stock anesthesia and Analgesia: best practices. NAVC Conference; 1914-1916.
- Laugier JP, Shuster S, Rosdy M, Csóka AB, Stern R, Maibach HI. (2000) Hyaluronidase decreases hyaluronic acid and CD44 in Human skin and in reconstituted human epidermis: evidence that hyaluronidase can permeate the stratum corneum. *British Journal of Dermatology.* 142: 226-233.
- Meyer K Hyaluronidases. In: P.D. (1971) Boyer (eds), *The Enzymes*, Molecular Biology Institute and Department of Chemistry, University of California, Los Angeles; 307-320 pp.
- Morton DJ, Kock MD. (1991) Stability of Hyaluronidase in solution with etorphine and xylazine. *J. Zoo Wildl. Med.* 22: 345-347.
- Mpanduji DG, Fyumagwa RD, Katale BZ, Maulid LM, Alfred Kikoti. (2012) Evaluation of hyaluronidase in combination with etorphine HCL for immobilizing African elephants (*Loxodonta africana*) in Tanzania. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.* 2: 393-396.
- Osofsky SA. (1997) A practical anesthesia monitoring protocol for free-ranging adult african elephants (*Loxodonta africana*). *Journal of Wildlife Diseases.* 33:72-77.
- Riebold TW. (1996) Anesthesia and immobilization of specific species: Ruminants. Lumb & Jones', *Veterinary Anesthesia III* Ed. William & Wilkins. 610-626.
- Rosu O, Udrescu LA, Birtoiu D, Manu E. (2014) Chemical immobilisation of letea feral horses (*Equus caballus*) using ketamine and medetomidine. *Proceedings of the International Conference on Diseases of Zoo and Wild Animals*, Warsaw, Poland. 190-195.
- Snyder SB, Ichard MJ, Foster WR. (1992) Etorphine, Ketamine, and xylazine in combination of exotic ruminants: a significant additive effect. *Proc. Joint Conf. Am. Assoc. Zoo Vet. and Am. Assoc. Wildl. Vet.* 253-263.



PUBBLICAZIONE ARTICOLI LARGE ANIMAL REVIEW

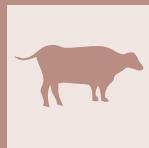
I medici veterinari interessati alla pubblicazione di articoli scientifici sulla rivista "LARGE ANIMAL REVIEW" devono seguire le indicazioni contenute nel file **Istruzioni per gli autori** consultabili al sito www.largeanimalreview.com

INFORMAZIONI:

Segreteria di Redazione - largeanimalreview@sivarnet.it

**SIVAR
PODOLOGIA**

Association assessment of single nucleotide polymorphism in Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like (*FEZL*) gene with mastitis susceptibility in Holstein cattle (*Bos taurus*)



GHADA E. ALI¹, MARWA A. IBRAHIM¹, SAID M. ZAKI¹

¹ Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Department of Biochemistry and Chemistry of Nutrition, Giza, 12211, Egypt

SUMMARY

The accentuation on improving the dairy industry has been to concentrate on breeds that have high milk yields, mainly Holstein. Bovine mastitis continues to be the most powerful disease threatening dairy industry worldwide. It remains the major challenge to the overall dairy industry regardless of the far reaching execution of mastitis control strategies. The immune response to mastitis is complex and requires the development of a sophisticated regulatory system to carry out functions at signal-specific and gene-specific levels which, can be used in dairy breeding selection. The aim of this study is to find out whether a three base insertion located at the glycine stretch of forebrain embryonic zinc finger-like (*FEZL*) gene, a transcription factor which possibly has an immune function, influences the milk somatic cell count (SCC) and mastitis susceptibility in Egyptian dairy cattle. Furthermore, relationships were explored between *FEZL* gene and its level of expression and semaphorine 5A (*SEMA5A*) gene level of expression, an immune gene through which *FEZL* has its immune function. Both *FEZL* and *SEMA5A* have an important antimicrobial role by controlling the neutrophilic migration to the site of mammary gland infection. Blood was collected from the jugular or mammary gland vein of 122 normal and mastitic unrelated Egyptian Holstein-Friesian dairy cattle. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was carried out to detect single nucleotide polymorphism (SNP) in the amplified glycine stretch of *FEZL*. The expression levels for *FEZL* and *SEMA5A* were assessed in milk samples. Our sequencing results proved that cattle carrying *FEZL* gene with glycine stretch containing 13 glycine residues have higher SCC and are more susceptible to mastitis than 12G *FEZL* cattle. Moreover, mastitis and high (SCC) were associated with up-regulation in the level of expression of both *FEZL* and *SEMA5A* genes. In conclusion, utilizing the SNP of *FEZL* gene before genetic selection for the dairy industry may be useful to control the incidence of mastitis.

KEY WORDS

Bovine mastitis, *FEZL*, *SEMA5A*, Polymorphism, SSCP.

INTRODUCTION

In numerous nations, the accentuation on enhancing dairy generation has been to concentrate on breeds that have high milk yields, mainly Holstein¹. Mastitis is one of the most common diseases influencing up to 40 percent of cows within a herd². It remains the major challenge to the overall dairy industry regardless of the far-reaching execution of mastitis control strategies³. The urgency for identifying hereditary markers associated with mastitis resistance has taken two ways: scanning for quantitative trait loci (QTL) as well as SNP in candidate genes⁴. SNPs are the most abundant polymorphism in eukaryotic genomes that can be used as a superlative marker type for characterization of economically important traits⁵.

The immune response to mastitis is complex and requires the development of a sophisticated regulatory system to carry out functions at signal-specific and gene-specific levels. It includes various different genes and cellular pathways, so

genes coding for immune factors that detect and eliminate pathogens are potential markers⁶. Forebrain embryonic zinc finger-like gene (*FEZL*) was identified as a QTL influencing mastitis resistance⁷. It belongs to the krueppel C2H2-type zinc-finger protein family and contains six C2H2 type zinc-finger domains and a glycine stretch⁸. It acts as a transcription factor, repressor, which binds to 5'-GCAG-3' core sequence in target genes⁹. Semaphorine 5A (*SEMA5A*) is one of the target genes of *FEZL*. Semaphorins are an extensive family of widely expressed secreted and membrane-associated proteins¹⁰.

Both *FEZL* and *SEMA5A* have an important antimicrobial role by controlling the neutrophilic migration to the site of mammary gland (MG) infection. When cows are infected with mastitis, *FEZL*, as a transcription factor, is able to induce tumor necrotic factor- α (TNF- α) and interleukin-8 (IL-8) through enhancing *SEMA5A*⁹. IL-8 is responsible for controlling the number of neutrophils migrating to the site of infection which is critical for the resolution of mastitis¹¹. The length of the glycine stretch in *FEZL* may influence its transcription activity. 12G *FEZL* promotes greater TNF- α and IL-8 expression, through the promotion of higher *SEMA5A* expression than 13G *FEZL*. This demonstrates that 12G *FEZL* may impacts to clinical mastitis more than 13G

Corresponding Author:
Marwa Ibrahim (marwa199@gmail.com).

FEZL where the impaired TNF- α and IL-8 expression controlled by *FEZL* and *SEMA5A* can clarify susceptibility of 13G *FEZL* cattle to mastitis⁹.

MATERIALS AND METHODS

Blood Samples

Blood was collected from the jugular or mammary gland vein puncture in vacutainer tubes containing EDTA as anticoagulant from 112 normal and mastitic unrelated Egyptian Holstein-Friesian dairy cattle (*Bos taurus*) randomly selected from different farms in different governorates (Giza, Fayoum, Beheira and Alexandria) in Egypt to maximize genetic diversity. Samples were kept at -20°C till used.

Genomic DNA Isolation

Genomic DNA was isolated from blood using Blood DNA preparation kit (Jena bioscience, Cat. No. PP-205s, Germany) and the DNA concentration was adjusted to 20 ng/ μ L¹².

PCR amplification

Genomic DNA spanning the glycine stretch of *FEZL* gene was amplified by PCR to amplify a 229 bp region that contains the SNP as determined in Holstein-Friesian dairy cattle population using High yield Master Mix (Jena Bioscience, Germany) and the primer sequence for the *FEZL* gene were used according to Sugimoto and Sugimoto; [forward: 5'-TCCAA-GACGCTGCTCAGTTA-3'; reverse: 5'CCACAGCCTG-GTTGATGAC-3']^{9,13}. Conditions for amplification were as follows: an initial denaturation occurred at 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 95°C denaturation for 1 minute, 62°C annealing for 1 minute and 72°C extension for 1 minute and a 10 minutes final extension step at 72°C. The specificity and yield of PCR products were checked by electrophoresis on a 2% agarose (Bioshop, Canada) in 1X TAE buffer (Tris base, glacial acetic acid, EDTA, DDW PH 8.3, Bioshop, Canada), stained with ethidium bromide (Sigma Aldrich, USA).

Single-strand conformation polymorphism (SSCP)

Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis was carried out to detect SNP in the amplified glycine stretch of *FEZL*. Ten microliters of the PCR product was mixed with 10 μ l of the denaturing loading buffer (formamide, bromophenol blue and xylene cyanol, Bioshop, Canada), denatured for 10 min at 98°C, rapidly chilled on an ice block and kept in -20°C deep freezer for 15 minutes then loaded onto 15% polyacrylamide gel (39:1) (6 ml polyacrylamide 50%, 2 ml 10X TBE, 12 ml D.W, 45 μ l APS, 25 μ l TEMED, Bioshop, Canada). Electrophoresis was performed in 1X TBE buffer (Tris base, Boric acid, EDTA, DDW PH 8.3, Bioshop, Canada) in the following conditions: 80V at 4°C for 10 hrs. SSCP gel was detected using silver nitrate (Vivantis, Malaysia) by rapid silver staining protocol and the patterns of DNA were observed as described by Blum *et al.*¹⁴.

Sequencing of the selected genotypes

Genotyping was performed by sequencing reactions of purified DNA using Big Dye TM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits on an ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystems, USA)¹⁵. Sequences of *FEZL* amplified fragments

were aligned using Nucleotide BLAST program of NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) for sequence homology searches against GenBank databases, *Bos Tauras FEZL* gene (NP_001033287.1) and *mutant Bos Taurus FEZL* gene (AAV85458.1).

Milk samples

Milk samples were collected aseptically and kept at 4°C where they were processed within 24 h to measure the SCC by Bentley Soma Count 150 (Bentley, USA) as described by Zecconi *et al.*¹⁶. Animals were divided according to their SCC into two main groups¹⁷:

(1) **Normal group:** Cows for which the log¹⁰ (SCC) values were below 200 X 10³ cells/ml were classified to the Low-SCC class (Normal) (72 Animals).

(2) **Mastitic group:** Cows for which the log¹⁰ (SCC) values were equal to or higher than 200 X 10³ cells/ml were classified to the High-SCC class (Mastitic) either subclinical or clinical mastitis (40 Animals).

Isolation of total RNA and reverse transcription

Total RNA was extracted from milk using QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Cat. No. 52304, Germany) after sedimentation of milk leukocytes. To remove any contamination by genomic DNA, the samples were submitted to digestion with DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen). The purity and concentration of the isolated RNA were ascertained spectrophotometrically using Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). RT-PCR was performed using RevertAid Reverse Transcriptase, 200 U/ μ l (Thermo Scientific, Cat. No. EP044, USA) following the guidelines provided¹⁸.

Quantitative real-time RT-PCR (qPCR) of *FEZL* and *SEMA5A* genes

Based on the genomic sequences of *FEZL* and *SEMA5A* mRNA available in GenBank; (NM_001038198.2) and (XM_002696441.2) respectively, the forward and reverse primers were designed by Primer 3-program (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_WWW.cgi). For *FEZL* [forward: 5'- AACGTTCTCGATGACTGG-3'; reverse: 5'- GTGACAGGCTGGGTTAAAA-3'] and for *SEMA5A* [forward: 5'-CAAGTGGCTAACGAACCAA-3'; reverse: 5'-AG TAGAAAGGCACCTCACCC-3']. The *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as a reference gene and amplified by the following primers according to Sugimoto *et al.* [forward: 5'- GCCCTCAACGACCAC TTGT -3'; reverse: 5'- CCTGTTGCTGTAGCAAATTCA- 3']⁹. Real-time PCR was performed by Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master kit (Thermo Fischer Scientific, Cat. No. K0371, USA). The cDNA was amplified by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 15 s and extension at 72°C for 45 s¹⁹. The fluorescence intensity was acquired at the annealing step of each amplification cycle and the specificity of the amplicons was checked by performing the "melting curve" analysis of all samples through one cycle of 95°C for 15 s, 55°C for 15 s and 95°C for 15 s. Each qRT-PCR was performed in triplicates with no template control (NTC) included in each experiment. The fold change over control samples was calculated using ΔCT , $\Delta\Delta CT$ and $2^{-\Delta\Delta CT}$ by Mxpro software Stratagene²⁰.

Statistical analysis

The statistical analysis for all studied genetic locus was carried out according to Zwierzchowski *et al.*²¹. Observed allelic and genotypic frequencies were calculated using Hardy-Weinberg equilibrium where it was assessed by Chi-square test for determination of the independence between allelic and genotypic frequencies. SCC data were analyzed by Least Square Means with associated standard error (LSM \pm S.E) using the General Linear Model (GLM) procedure of the Statistical Analysis System (SAS/STAT program, version 7, 2002). Differences between the groups were assessed using student (t) test. Statistical significance was declared at a P level of < 0.05 by Duncan's multiple comparisons.

RESULTS

PCR amplification and polymorphism in *FEZL* gene

Glycine stretch of *FEZL* gene was successfully amplified giving rise to 229 bp amplicon (Figure 1A). The SSCP results revealed the presence of three clearly definable SSCP patterns (A, B and C) (Figure 1B).

Sequencing of *FEZL* gene

The sequencing results of the specific purified PCR product

of *FEZL* gene for both normal and mastitic samples revealed the presence of two isoforms of *FEZL* gene according to the length of its glycine stretch (Figure 2).

Genotypes and alleles frequency for *FEZL* gene

The allelic and genotypic frequencies of *FEZL* SNP in normal and mastitic animals are shown in (Table 1) and (Table 2), respectively. Allele A showed the highest frequency (0.923 and 0.892 in normal and mastitic animals, respectively). The obtained exact P values for χ^2 test in all populations confirmed the accordance with the Hardy-Weinberg distribution in all investigated animals.

Impact of *FEZL* genetic polymorphism on SCC

Results of association analysis of *FEZL* SNP with SCC revealed that the CC genotype has the highest mean value of SCC, while, the AB genotype has the lowest mean value of SCC as shown in (Table 3).

Expression of *FEZL* and *SEMA5A* genes

Quantitative RT-PCR analysis showed the presence of significant elevation in the expression level of both *FEZL* and *SEMA5A* genes in mastitic samples compared to normal samples by three and two folds, respectively (Figure 3).

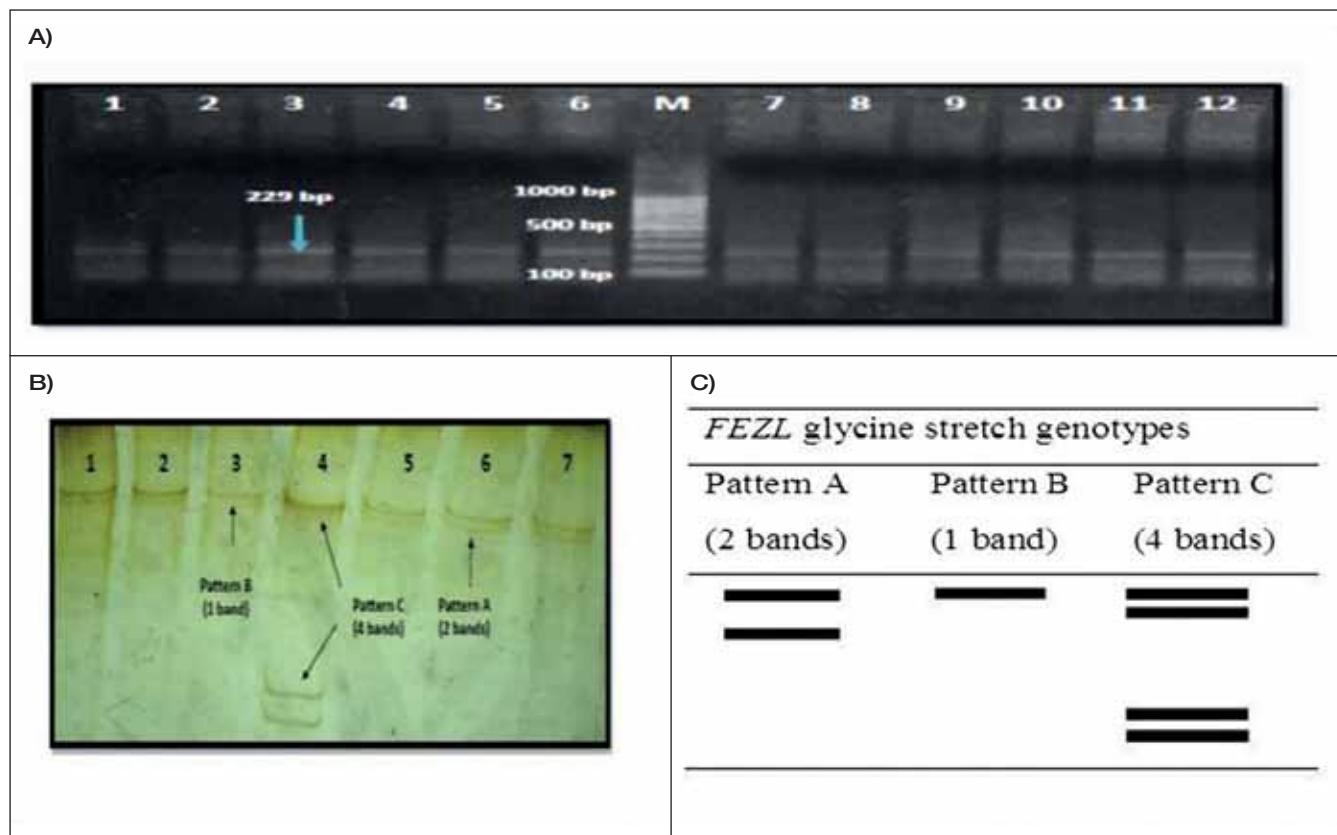
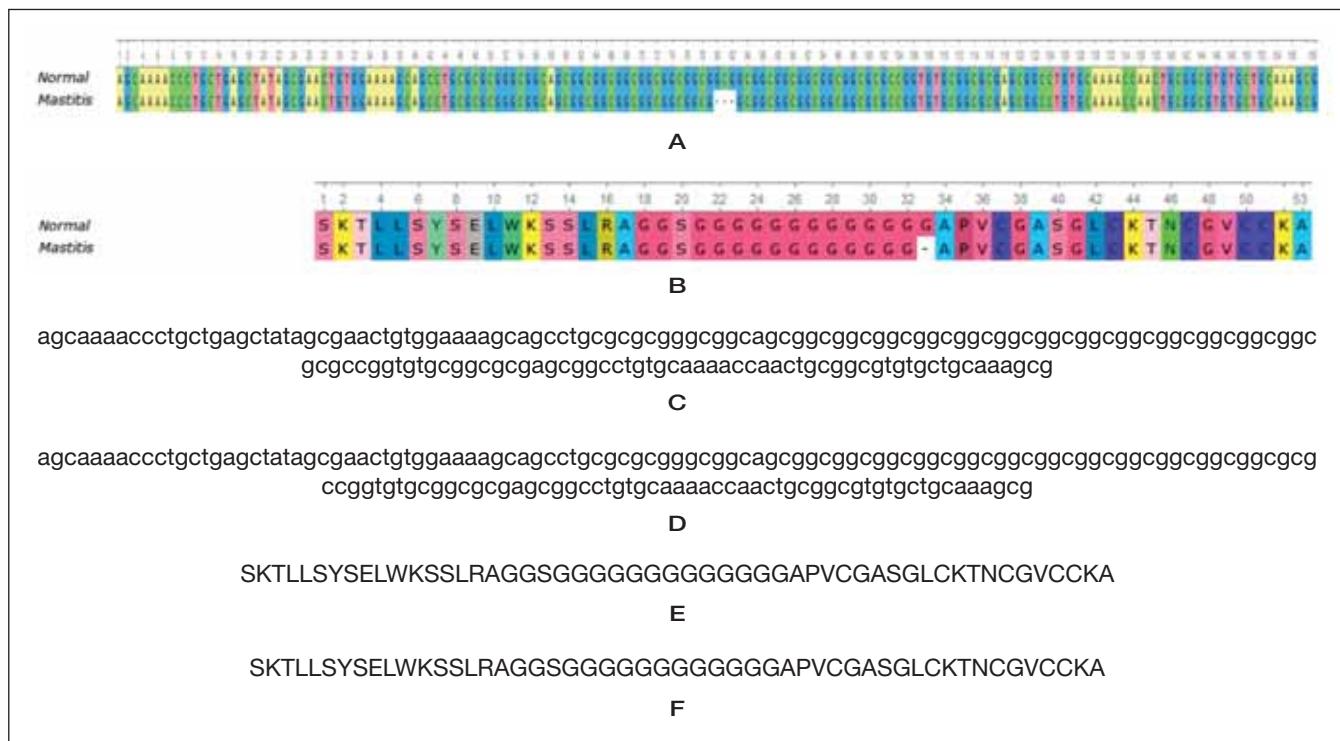


Figure 1 - PCR-SSCP for *FEZL* gene.

A) Agarose gel (2%) showing PCR products of Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like gene (*FEZL*) of normal and mastitic samples. Lane M: 100bp DNA molecular weight marker; Lanes (1-6): Normal samples; Lanes (7-12): Mastitic samples. Single specific bands of 229 bp were clear in all lanes.

B) PCR-SSCP for *FEZL* gene in normal and mastitic samples. 15% non-denaturing Polyacrylamide gel for *FEZL* gene: Denatured PCR products of *FEZL* gene separated in 15% non-denaturing PAGE (39:1) stained with silver. Lanes (1-4): Normal samples; Lanes (5-7): Mastitic samples. Lane 1, 2, 5, 6 and 7: Pattern A (2 bands); Lane 3: Pattern B (1 band); Lane 4: pattern C (4 bands).

C) Schematic representation of SSCP patterns for indicated *FEZL* gene.

**Figure 2** - The sequencing results of the *FEZL* amplicons in both normal and mastitic samples.

(A) The Clustal W alignment of the *FEZL* sequence obtained by sequencing of the target gene fragment in both normal and mastitic samples; (B) The Clustal W alignment of the deduced amino sequences in both the normal and mastitic samples; (C) Sequencing results of the in normal cattle; (D) Sequencing results of the mastitic cattle; (E) The deduced amino acid sequence of the *FEZL* fragment in the normal samples; (F) The deduced amino acid sequence of the *FEZL* in *mastitic* samples.

Table 1 - Allelic and genotypic frequencies of *FEZL* gene and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) in normal samples.

Glycine stretch in <i>FEZL</i> gene in normal samples (N=72)									
	Genotypes						Allelic frequency		
	AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
Observed number	66	5	0	0	0	1			
Expected number	61.33	4.52	1.86	0.083	0.068	0.014	0.923	0.034	0.014
Genotype frequency	0.917	0.069	0	0	0	0.014			
X ²	71.85								

X² = Chi square test.
A degree of freedom (df) of 3 [number of genotypes (6) - number of alleles (3)], Chi-square value shows a difference (P < 0.05) when compared with the tabulated Chi-square value (7.81), so the deviation between observed genotypic frequencies and those expected under HWE in normal samples was statistically significant (P < 0.05) suggesting that Holstein-Friesian population sample was not in equilibrium for glycine stretch of *FEZL* locus.

Table 2 - Allelic and genotypic frequencies of *FEZL* gene and Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) in mastitic samples.

Glycine stretch in <i>FEZL</i> gene in mastitic samples (N=40)									
	Genotypes						Allelic frequency		
	AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
Observed number	34	1	0	0	0	5			
Expected number	29.75	0.86	8.63	0.006	0.125	0.625	0.8625	0.0125	0.125
Genotype frequency	0.85	0.025	0	0	0	0.125			
X ²	40.01								

X² = Chi square test.
A degree of freedom (df) of 3 [number of genotypes (6) - number of alleles (3)], Chi-square value shows a difference (P < 0.05) when compared with the tabulated Chi-square value (7.81), so the deviation between observed genotypic frequencies and those expected under HWE in mastitic samples was statistically significant (P < 0.05) suggesting that Holstein-Friesian population sample was not in equilibrium for glycine stretch of *FEZL* locus.

BOVALTO
Respi **INTRANASAL**

PERCHÉ RISCHIARE?



- Efficace stimolazione dell'immunità mucosale**
- Efficace anche in presenza di immunità materna**
- Protezione precoce ed efficace**
- Conferisce immunità quando serve**
- Ceppi virali recenti**
- Modalità di somministrazione unica**

IL PORTALE DEL VETERINARIO DI FIDUCIA

Il portale del Veterinario di Fiducia è una piattaforma multimediale rivolta a Medici Veterinari che svolgono attività clinica e manageriale negli allevamenti italiani.

È gestito dalla SIVAR (Società Italiana Veterinari per Animali da Reddito - Federata ANMVI) che ne è anche proprietaria.

Tutti i dati vengono trattati ai sensi della normativa sulla privacy. Il portale contiene:

- notizie
- materiali didattici
- DES (Database Epidemiologico Sanitario)
- DDD (Database per il Monitoraggio degli Antibiotici)
- forum di discussione

AREA LIBERA DEL PORTALE

Alcune sezioni e funzioni (es. notizie e materiali didattici) sono di libero accesso e non richiedono l'inserimento di credenziali (né password né username EGO).

AREA RISERVATA DEL PORTALE

Alcune sezioni e funzioni sono accessibili solo utilizzando il proprio Codice Ego (username e password) dopo averne richiesto l'attivazione alla casella: vetdifiducia@anmvi.it oppure info@sivarnet.it.

Sono in area riservata le seguenti funzionalità:

- DES (Database Epidemiologico Sanitario)
- DDD (Database per il Monitoraggio degli Antibiotici)
- forum di discussione
- alcuni materiali didattici

DES

DDD

**CODICE
EGO**



DATABASE EPIDEMIOLOGICO SANITARIO

Raccoglie dati sanitari ed epidemiologici di cui dispone solo il veterinario d'azienda

DEFINED DAILY DOSE

Software sperimentale che consente di calcolare le quantità di antibiotici somministrati sui propri allevamenti

Se sei un Socio SIVAR in regola con la quota annuale, puoi richiedere di essere abilitato scrivendo a: vetdifiducia@anmvi.it oppure info@sivarnet.it



ISCRIVITI ALLA SIVAR PER IL 2019 E RICHIEDI L'ABILITAZIONE
AI SERVIZI DEL PORTALE VETERINARIO DI FIDUCIA:
AVRAI ACCESSO A DES, DDD E FORUM
INVIO RICHIESTA A info@sivarnet.it o vetdifiducia@anmvi.it

Table 3 - LSM and SE for SCC across glycine stretch of *FEZL* gene genotypes.

	Genotypes		
	AA	AB	CC
Mean±SE	454.27±43.7 ^b	226.16±4.9 ^c	674.92±48.1 ^a

^{a-c} Means with different superscripts differ ($P < 0.05$). The mean values indicate the presence of a difference ($P < 0.05$) in SCC among the three genotypes of glycine stretch of *FEZL* gene where the CC genotype has the highest mean value of SCC.

DISCUSSION

Exploring the genetic background of economic traits is a major goal in animal genetics and breeding programs. SNPs have been the markers of choice in recent years, due to their high stability, density and their highly automated detection techniques²². Several immune genes and pathways, including recruitment and functionality of neutrophils and humoral or cellular adaptive immune response, have proved to play an important role in the severity of mastitis²³. Therefore, the present study was conducted to illustrate the genotyping of a gene which is responsible for the immune response of animal against mastitis, *FEZL* gene, and to correlate the effect of its genetic variability with SCC. Milk SCC has been identified as the gold standard examination that measures the degree of udder inflammation. SCC has a very strong genetic correlation with mastitis ranging between 50 and 80% with an average of 78%²⁴.

FEZL gene contains six C2H2 type zinc-finger domains and a glycine stretch where the three base insertion resulted in an extension of 12 glycines (12G) to 13 glycines (13G). This polymorphism was reported to be significantly associated with SCC and susceptibility to mastitis in dairy cattle in Japan^{8,9}.

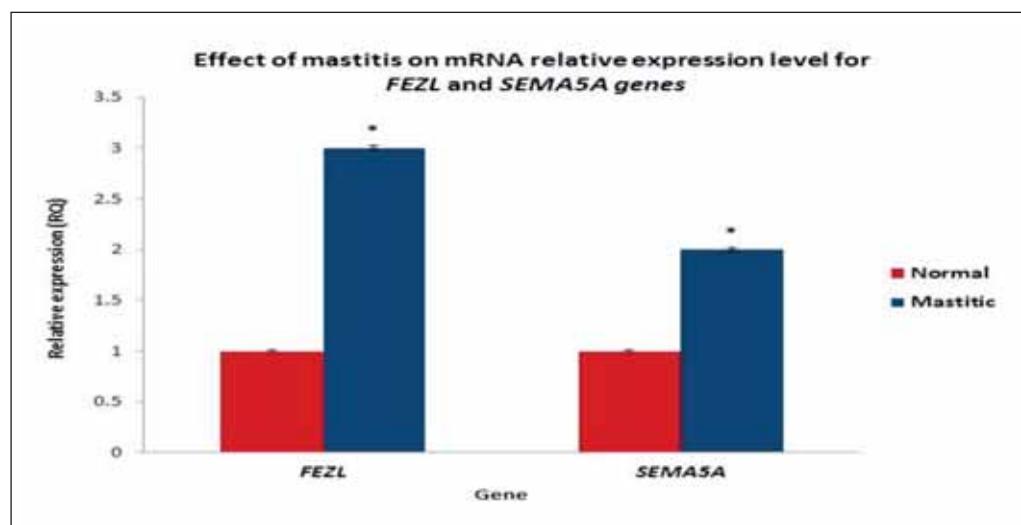
Our results showed three clearly definable SSCP patterns (A, B and C). The frequencies of the three genetic variants were 0.917, 0.069 and 0.014 for normal animals and 0.85, 0.025 and 0.125 for mastitic animals, respectively. The difference between observed genotypic frequencies and those expected under HWE were statistically significant ($P \leq 0.05$), suggesting that the Egyptian Holstein-Friesian population sample

was not in equilibrium for glycine stretch of *FEZL*, therefore there is a selective advantage for the glycine stretch locus of *FEZL* gene and it could be a putative locus for marker-assisted selection. These results came in the same line with Sugimoto *et al.* who correlated the presence of 3 genotypes of *FEZL* to the glycine stretch in Japan, 12G/12G, 12G/13G and 13G/13G *FEZL*⁹. Sugimoto *et al.* on their studies on genotyping of *FEZL* in 918 sires found that 97 sires had a heterozygous 12G/13G genotype and 821 sires had a homozygous 13G/13G genotype⁹.

The major allele which appeared in only two of the three genotypes is allele (A) where it has the highest frequency (0.923 and 0.892 in normal and mastitic animals, respectively). On the other hand, allele (B) and (C) appears in lower frequencies (0.034 and 0.0125) and (0.014 and 0.125) in normal and mastitic animals, respectively. Allele (B) shows the least frequency in mastitic animals, while allele (C) shows the least frequency in normal animals. Moreover, the presence of allele (B) is associated with lower SCC while the presence of allele (C) is associated with higher SCC. The above-mentioned results revealed that the presence of (C) allele may be associated with both higher susceptibility to mastitis and higher SCC. These results agreed with Sonstegard *et al.* which stated that 12G allele frequencies were less than 3% in Holstein sires in North America²⁵. This allele tended to have lower SCC during the first lactation.

The sequencing results of the specific purified PCR product of *FEZL* gene for both normal and mastitic samples revealed the presence of two isoforms of *FEZL* gene according to the length of its glycine stretch. These results were found to be compatible with that of the SSCP results. Samples which have the pattern C (4 bands) on SSCP gel were proved to contain a three-base insertion in glycine stretch which results in its extension from 12G to 13G. On the other hand, samples which have pattern A (2 bands) and pattern B (1 band) on SSCP gel contain only 12 glycine residues in their glycine stretch.

Considering the relationship between length of glycine stretch and SCC, our results proved that CC genotype, which carries 13G *FEZL*, has the highest mean value of SCC, while AA and AB genotypes, which carry 12G *FEZL*, have lower mean values of SCC suggesting that 13G *FEZL* is more susceptible to mastitis than 12G *FEZL*. These results came in

**Figure 3**

The effect of mastitis on the mRNA expression level of *FEZL* and *SEMA5A* genes. RT-PCR results of milk samples: The mRNA relative expression of *FEZL* and *SEMA5A* genes. Data were expressed as means ± SEM of triplicate experiments. Groups having (*) are significantly different compared with their control groups at $p < 0.05$.

similar line with many authors who reported that there is a significant correlation between different genotypes and SCC and mastitis susceptibility. Sugimoto *et al.* correlate higher mastitis susceptibility of 13G *FEZL* than 12G *FEZL*⁹. Moreover, Sugimoto *et al.* reported that at almost every age, the proportion of affected heterozygous 12G/13G daughters was significantly lower than that of affected homozygous 13G/13G daughters and that 13G/13G *FEZL* cattle have twice the rate of susceptibility to mastitis than 12G/12G *FEZL* cattle⁷. These findings might confirm that *FEZL* affects the animal susceptibility to mastitis as well as SCC.

Gene expression profiling of MG tissue is a powerful tool that has been used to catalog the genes expressed during lactation²⁴. Numerous studies have examined gene expression in the bovine MG by performing mammary biopsies; however, such techniques are invasive, disturb the normal lactation process, are labor-intensive and are costly. An alternative sampling procedure has been proposed by isolating mRNA directly from somatic cells that are naturally released into milk during lactation²⁵.

Our RT-PCR results revealed a significant up-regulation of the expression level of *FEZL* and *SEMA5A* by three and two folds, respectively. In agreement, the induction of expression level of *FEZL* and *SEMA5A* has been reported in mastitic cattle where *FEZL* expression was greater in the mastitic quarter than in the cured quarter of the same animal¹⁰. Moreover, it has been indicated that 12G *FEZL* stimulates greater *SEMA5A* expression than 13G *FEZL* and that 12G/13G *FEZL* cattle have greater *SEMA5A* expression than in 13G/13G *FEZL* cattle¹⁰. The enhancement of *FEZL* expression in the MG by intramammary infection is due to its important antimicrobial role where it is responsible for the control of cytokine expression. When cows are infected with mastitis, *FEZL* induces TNF- α and IL-8 through enhancing *SEMA5A*, which represents a plausible mechanism to explain the enhanced antimicrobial activity of *FEZL*-expressing cells²⁶. This induced production of IL-8 by TNF- α can regulate the number of neutrophils migrating to the site of infection²⁷. Neutrophils are highly effective phagocytes for clearing infecting bacterial pathogens from host tissue²⁸. During mastitis, neutrophils become the predominant (>95%) cell type in milk²⁹. In contrast, our RT-PCR run against other study which did not observe significant differences in the expression level of *FEZL* and *SEMA5A* between normal and mastitic cattle³⁰.

It seems that the increase in the level of expression of both *FEZL* and *SEMA5A* genes in mastitic Egyptian dairy Holsteins might improve the significant correlation between *FEZL* and animal immune system. Moreover, the high SCC associated with animals carrying a three-base insertion in glycine stretch of *FEZL* gene could provide a new avenue for MAS programs in Egypt.

CONCLUSIONS

The current study can conclude that cattle carrying *FEZL* gene with glycine stretch containing 13 glycine residues have higher SCC and are more susceptible to mastitis than 12G *FEZL* cattle. The higher susceptibility to mastitis might be due to impaired TNF- α and IL-8 expression controlled by *FEZL* and *SEMA5A*. This study may be considered the first

record which reported the genetic variation *FEZL* gene in the Egyptian Holstein-Friesian cattle. Thus, in order to control the incidence of mastitis in Egypt, we recommend utilizing the SNP of *FEZL* gene before genetic selection for the dairy industry.

AUTHOR CONTRIBUTIONS STATEMENT

Said M. Zaki conceived and designed the experiment, Ghada E. Ali executed the experiment, Ghada E. Ali and Marwa A. Ibrahim analyzed the results. All authors interpreted the data, critically revised the manuscript for important intellectual contents and approved the final version.

References

1. Felius M., Theunissen B., Lenstra, J.A. (2014). Animal review: Conservation of cattle genetic resources: the role of breeds. *J Agric Sci*, 153: 152-162.
2. Yang M., Shi J., Tian J., Tao J., Chai M., Wang J., Xu Z., Song Y., Zhu K., Ji P., Liu G. (2017). Exogenous melatonin reduces somatic cell count of milk in Holstein cows. *Sci Rep*, 7: 43280.
3. Down P.M., Bradley A.J., Breen J.E., Hudson C.D., Green M.J. (2016). Current management practices and interventions prioritised as part of a nationwide mastitis control plan. *Vet Rec*, 178: 449.
4. Pighetti G.M., Elliott A.A. (2011). Gene Polymorphisms: The keys for marker assisted selection and unraveling core regulatory pathways for mastitis resistance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 16: 421-432.
5. Song Q., Jia G., Hyten D.L., Jenkins J., Hwang E.Y., Schroeder S.G., Osorno J.M., Schmutz J., Jackson S.A., McClean P.E., Cregan P.B. (2015). SNP Assay Development for Linkage Map Construction, Anchoring Whole-Genome Sequence, and Other Genetic and Genomic Applications in Common Bean. *G3*, 5(11): 2285-2290.
6. Thompson-Crispi K., Atalla H., Miglior F., Mallard B.A. (2014). Bovine mastitis: frontiers in immunogenetics. *Front Immunol*, 5: 493.
7. Sugimoto M., Itoh T., Gotoh Y., Kawahara T., Moriya H., Uchimura Y., Sugimoto Y. (2010). Short communication: Enhanced clinical mastitis resistance in Holsteins with a *FEZL* p.Gly105 (12_13) polymorphism. *J Dairy Sci*, 94: 2103-2107.
8. Sugimoto M., Uchiza M., Kuniyuki M. (2011). Effects of a Forebrain Embryonic Zinc Finger-Like p.Gly105 (12_13) polymorphism on mastitis resistance: an embryo-transfer study, *J Dairy Sci*; 94(4):2103-7.
9. Sugimoto M., Fujikawa A., Womack J.E., Sugimoto Y. (2006). Evidence that bovine forebrain embryonic zinc finger-like gene influences immune response associated with mastitis resistance, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 6454-6459.
10. Tam K.J., Hui D.H.F., Lee W.W., Dong M., Tombe T., Jiao I.Z.F., Khosravi S., Takeuchi A., Peacock J.W., Ivanova L., Moskalev I., Gleave M.E., Buttyan R., Cox M.E., Ong C.J. (2017). Semaphorin 3C drives epithelial-to-mesenchymal transition, invasiveness, and stem-like characteristics in prostate cells. *Sci Rep*, 7: 11501.
11. Brazil J.C., Parkos C.A. (2016). Pathobiology of neutrophil-epithelial interactions. *Immunol Rev*, 273(1): 94-111.
12. Hirakawa Y., Ishida K. (2014). Polyploidy of endosymbiotically derived genomes in complex algae. *Genome Biol Evol*, 6: 974-980.
13. Sugimoto M., Sugimoto Y. (2012). Variant in the 5' untranslated region of insulin-like growth factor 1 receptor is associated with susceptibility to mastitis in cattle. *G3*, 2: 1077-1084.
14. Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.
15. Kamel S., Ibrahim M.A., Awad E.T., El-Hindi H.M.A., Abdel-Aziz S.A. (2018). Molecular cloning and characterization of the novel CYP2J2 in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). *Int J Biol Macromol*, 120(PtB): 1770-1776.
16. Zeconi A., Binda E., Borromeo V., Piccinini R. (2005). Relationship between some *Staphylococcus aureus* pathogenic factors and growth rates and somatic cell counts. *J Dairy Res*, 72: 203-208.

17. Zwierzchowski L., Siadkowska E., Oprzadek J., Flisikowski K., Dymnicki E. (2010). An association of C/T polymorphism in exon 2 of bovine insulin-like growth factor 2 gene with meat production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. Czech J Anim Sci, 55: 227-233.
18. Abdel Aziz RL, Abdel-Wahab A, Abo El-Ela FI, Hassan NEY, El-Nahass ES, Ibrahim MA, Khalil AAY. (2018)). Dose- dependent ameliorative effects of quercetin and l-Carnitine against atrazine- Induced reproductive toxicity in adult male Albino rats. Biomed Pharmacother.; 102:855-864.
19. Kamel S, Ibrahim M, Awad ET, El-Hindi HMA, Abdel-Aziz SA.(2018). Differential expression of CYP2j2 gene and protein in Camelus dromedarius.J Biol Regul Homeost Agents. NOV-DEC; 32(6):1473-1477.
20. Khalaf AA, Galal MK, Ibrahim MA, Allah AAA, Afify MM, Refaat R. (2019) The Terminalia laxiflora modulates the neurotoxicity induced by fipronil in male albino rats. Biosci Rep.; 39(3):BSR20181363.
21. Cortés O, Eusebi P, Dunner S, Sevane N, Cañón J. (2019). Comparison of diversity parameters from SNP, microsatellites and pedigree records in the Lidia cattle breed. Livest Sci, 219: 80-85.
22. Weigel K.A., Shook G.E. (2018). Genetic selection for mastitis resistance. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 34(3): 457-472.
23. Malik T.A., Mohini M., Mir S.H., Ganaie B.A., Singh D., Varun T.K., Howal S., Thakur S. (2018). Somatic cells in relation to udder health and milk quality-a review. J Anim Health Prod, 6(1): 18-26.
24. Urioste J.I., Franzén J., Windig J.J., Strandberg E. (2012). Genetic relationships among mastitis and alternative somatic cell count traits in the first 3 lactations of Swedish Holsteins. J dairy sci, 95(6): 3428-3434.
25. Sonstegard T.S., Van Tassell C.P., Li R. (2005). Characterization of FEZL effects on SCS in a sample of North American Holsteins, ADSA/ASAS, 177346, (Joint Meeting) p. 248. (Abstr.).
26. Cánovas A., Rincón G., Bevilacqua C., Islas-Trejo A., Brenaut P., Hovey R.C., Boutinaud M., Morgenthaler C., VanKlompenberg M.K., Martin P., Medrano J.F. (2014). Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. Sci Rep, 4: 5297.
27. Detilleux J.C. (2008). Genetic factors affecting susceptibility to udder pathogens. Vet Microbiol, 134(1-2): PP. 157.
28. Nourshargh S., Alon R. (2014). Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. Immunity, 41(5): 694-707.
29. Garcia M., Elsasser T.H., Biswas D., Moyes K.M. (2015). Effect of citrus-derived oil on bovine blood neutrophil function and gene expression in vitro. J Dairy Sci, 98 (2): 918-926.
30. Fonseca I., Antunes G.R., Paiva D.S., Lange C.C., Guimarães S.E.F., Martins M.F. (2011). Differential expression of genes during mastitis in Holstein-Zebu crossbreed dairy cows. Genet Mol Res, 10(3): 1295-1303.



AnmviOggi è il quotidiano on-line di informazione professionale dell'ANMVI. Il primo e unico quotidiano di informazione professionale via internet che ogni giorno pubblica notizie sui maggiori fatti di interesse per la Professione Veterinaria. AnmviOggi viene inviato gratuitamente agli iscritti delle liste telematiche dell'Anmvi, a chi ne fa richiesta ed è disponibile sul sito www.anmvioggi.it

Vet Journal pubblica notizie e reportage di tutti i più importanti eventi nazionali ed internazionali e fornisce una informazione scientifica rigorosa sul mondo della medicina veterinaria e delle bioscienze in generale. Fornisce dal 2004 un servizio di traduzione in italiano degli abstract dei più importanti lavori della letteratura scientifica internazionale. La newsletter di Vet Journal viene inviata gratuitamente agli iscritti delle liste telematiche dell'ANMVI, a chi ne fa richiesta il lunedì, il mercoledì e il venerdì ed è disponibile sul sito www.evsrl.it/vet.journal/



*Chi non li ricevesse ed è interessato ne può far richiesta per e-mail alle redazioni:
anmvioggi@anmvi.it - efebbo@scivac.it*

Spasmolax

20 mg/ml

scopolamina butilbromuro

lo Spasmolitico Vero.



CONFEZIONE
Flacone da 50 ml



ATI, animali in salute.

Azienda Terapeutica Italiana A.T.I. - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) - Tel. 051 791517 - www.ativet.it - info@ativet.it



Investigation of the relationship between kids vitality and placental characteristics in hair goats



SELCUK OZYUREK

Erzincan Binali Yildirim University, Cayirli Vocational School, Veterinary Department, Erzincan, Turkey

SUMMARY

The research was carried out to determine the relationship between kids birth weight and placental characteristics of hair goats grown in poor condition during the critical period of pregnancy. Particularly, it was aimed to investigate the placental relation of high mortality rate especially in twin kids. Placentas were collected from 52 goats at normal kidding. There were 36 singleton and 16 twin pregnancies and 42 female and 26 male kids. During the mating period (September), the goats grazed on poor pasture for 12 hours and nothing was added to the pasture. The date of mating was recorded and goats were fed indoor after the 60th day of pregnancy. During the time they were inside, 200 g/day barley, *ad libitum* the hay and water were given. Kids were weighed and sexed at 12-24 h after birth. Placentas were collected immediately and brought to laboratory and placentas were carefully disturbed water and weighed. Each placenta was opened with a scalpel and the cotyledons were separated from chorioallantois and counted. The effects of birth type, sex, parity and vitality on placental and cotyledon traits were analyzed by the general linear model procedure in SPSS using a completely randomized design. When the birth weight was $2.83 \pm .07$ in live kids, it was $1.31 \pm .23$ in dead kids and this difference was statistically very significant ($p < 0.001$). In addition, placental efficiency was affected by the vitality of kids ($p < 0.05$) and we observed that there was no x large cotyledon (>51 mm diameter) in the dead kids. The low placental and cotyledon characteristics of kids who died before weaning showed that placental and cotyledon traits have an effect on kids' vitality. The result showed that there were significant differences ($p < 0.05$) among parity for placental weight and cotyledon density. Birth type affected placental weight ($p < 0.001$), cotyledon density ($P < 0.01$) and average cotyledon surface area (ACSA) ($p < 0.05$). Large cotyledon number, cotyledon length and cotyledon width were affected ($P < 0.01$) by birth type. It was observed that there is a direct correlation between ACSA and cotyledon length ($r = 0.985$; $p < 0.01$), cotyledon width ($r = 0.969$; $p < 0.01$). However, a negative correlation between ACSA and small cotyledon number (-0.553; $p < 0.01$), cotyledon density (-0.779; $p < 0.01$) is determined for hair goats. As a result, we suggest that cotyledon efficiency is a much more precise and reliable measure of placenta functional ability. These data have shown that manipulation of the prenatal period can affect birth weight, newborn losses, average daily live weight gain, market weight, health and meat production economy and profitability in the livestock industry.

KEY WORDS

Average cotyledon surface area, birth type, cotyledon, hair goat, placenta.

INTRODUCTION

Breeding small ruminants, goats in particular, is an important livestock activity for people living in rural areas. In Turkey, there are around 10 million hair goats.¹ They have been adapted to the climate and geographical conditions of Turkey; therefore, the hair goats are resistant to diseases, heat and cold weather and have high ability to benefit from rough and poor pastures. In the studies, the litter size of hair goats is reported as 1.09 and 1.18.^{2,3} In addition, Atay et al.² reported that there were reproductive problems and loss of kids in weaning. It has been reported that birth weight, breed, region, birth type, and parity affect the survival and mortality rate of the kids.⁴

The placental growth in goats occurs before fetal growth and the development of the placenta is very important for best fetal growth.⁵ Because the placenta helps the circulation of food, gas and waste products into maternal and fetal me-

tabolism.⁶ Goat and sheep have an epitheliochorial - cotyledonary placenta, as well as the number and size of cotyledons detect the appropriate area for nutrient transfer between mother and fetus systems.⁷ Thus, placental mass and nutrient exchange capacity play an essential role in determining the fetal growth organs and birth weight, postpartum vitality and long-term health. There is a significant positive correlation (generally 0.5-0.09) between the birth and placental weight in sheep and humans.⁸ These data have shown that in the livestock industry, manipulation of the prenatal period will affect birth weight, newborn losses, average daily live weight gain, market weight, health and meat production economy and profitability.⁹

The nutritional level of a mother for the regulation of fetal and placental development in sheep and goats have an important effect during the pregnancy.⁶ It is possible to manipulate the placental development of goats by feeding.¹⁰ Since goat farming is carried out under extensive conditions, it is not possible to regulate and control placental development in Turkey. Because the mating season is in autumn, goats are grazing in the poor pasture and no additional feeding is done. In addition, researchers reported that the nutritional

Corresponding Author:
Selcuk Ozyurek (sozyurek@erzincan.edu.tr).

consumption of grazing sheep in West America is 50% less than the recommendations of the National Research Council (NRC) without supplementation.¹¹

Although there are studies for placental traits on many species and breeds, there are no studies on hair goats. As a result, our main aim in this study was to determine the relation between kid weight and placental characteristics of hair goats grown in poor conditions during the critical periods of pregnancy. In particular, it was aimed to investigate the relation between placental traits and the high mortality rate of kids.

MATERIALS AND METHODS

The study was applied in a private farm located in the Cayirli district in the Erzincan province ($39^{\circ} 49' N$, $39^{\circ} 57' E$ and sea level 1618 m). In this study, we used 52 hairs goats aged between 3-6 years. The distribution of kids according to parity, birth type, and sex, was shown in Table 1. There were 36 singleton and 16 twin pregnancies and 42 female and 26 male kids. During the mating period (September), the goats grazed on poor pasture for 12 hours and nothing was added to the pasture. The date of mating was recorded and goats

were fed indoor after the 60th day of pregnancy. During the time they were inside, 200 g/day barley, *ad libitum* the hay and water were given.

Kids were weighed and sexed at 12-24 h after birth. Placentas were collected immediately and brought to laboratory and placentas were carefully disturbed water and weighed. Each placenta was opened with a scalpel and the cotyledons were separated from chorioallantois and counted. After that, cotyledons were classified by size according to Konyali et al.¹² and Ocak et al.¹³ and recorded. The length (CL), width (CWi) and depth (CDe) of the 30 cotyledons of the same size chosen from the placenta were measured by digital compass. Placental efficiency (PE), cotyledon density (CD) and cotyledon efficiency (CE) were calculated according to Konyali et al.¹². Additionally, TCSA was calculated according to the following formula:

$$[((CWi + CL) / 4) \times 2] \times 3.14 (\pi) \times TCSA^{12,13,14}$$

Average cotyledon surface area (ACSA) was obtained by dividing TCSA by cotyledon number. The kids were weaned after two months from birth. Only six of the 68 kids died in the two-month study.

The effects of birth type, sex, parity and vitality on placental and cotyledon traits were analyzed by the general linear model (GLM) procedure in SPSS using a completely randomized design. Additionally, kid sex was used in the model as a cofactor to adjust the placental and cotyledon traits except vitality. To determine relationships between placental and cotyledon traits Pearson correlation was used, at the 95% confidence interval.^{12,15}

RESULTS

According to the vitality of kids, the mean of birth weight (BW), placental and cotyledon traits were given in Table 2. When BW was 2.83 ± 0.07 kg in live kids, it was 1.31 ± 0.23 kg in

Table 1 - The distribution of kids according to parity, birth type, and sex.

Birth type	Parity 2-3		Parity ≥4		Total
	Female	Male	Female	Male	
Single	8	8	10	10	36
Twin	2	2	22	6	32
Total	10	10	32	16	68
Total (parity)	18		34		

Table 2 - Placental and cotyledon traits according to the vitality of kids.

	Live kids				Dead kids				P
	Medium	SE	Minimum	Maximum	Medium	SE	Minimum	Maximum	
BW	2.83	.07	2.1	3.78	1.31	.23	1.0	1.7	.000
PW	390.4	24.71	200	690	293.3	79.43	180	350	.252
CN	98.74	3.28	56	127	86.66	10.54	48	106	.282
CNs	5.90	.92	0	22	4.00	2.97	0	6	.545
CNm	71.61	3.53	18	102	75.00	11.36	37	94	.778
CNI	20.58	3.14	0	59	7.66	1.10	6	11	.231
CNxI	.61	.17	0	4	–	–	–	–	–
CL	2.88	.07	1.65	3.75	2.66	.23	2.57	2.72	.396
Cwi	2.01	.05	1.3	2.4	1.81	.16	1.64	1.90	.259
Cde	.39	.01	0.2	0.64	.36	.05	0.30	0.40	.656
PE	10.58	.34	7.67	16.43	7.43	1.10	6.43	9.44	.010
CD	.28	.01	0.12	0.51	.29	.05	0.27	0.30	.854
CE	5.36	.26	3.59	8.74	3.73	.84	2.93	5.35	.075
ACSA	7.68	.19	4.63	9.66	7.03	.61	6.62	7.25	.324

BW: Birth weight; PW: Placental weight; CN: Cotyledon number; CNs: Cotyledon number small (<10 mm diameter); CNm: Cotyledon number medium (between 10 and 30 mm diameter); CNI: Cotyledon number large (between 31 and 50 mm diameter); CNxI: Cotyledon number x large (>51 mm diameter); CL: Cotyledon length; Cwi: Cotyledon width; Cde: Cotyledon depth; PE: Placental efficiency; CD: Cotyledon density; CE: Cotyledon efficiency; ACSA: Average cotyledon surface area.

Table 3 - Effect of parity, birth type and sex on placental traits ($X \pm SE$).

	BW (kg)	PW (g)	CN	PE	CD	CE	ACSA (cm ²)
Mean	2.63±.08	363.7±13.6	99.48±2.7	10.72±.2	0.292±.01	5.12±.21	7.58±.13
Parity	0.322	0.045	0.525	0.117	0.033	0.530	0.207
2-3	2.51±.14	321.5±24.2	102.05±4.8	11.42±.5	0.325±.01	4.92±.38	7.33±.23
≥4	2.76±.07	406.0±12.6	96.90±2.5	10.01±.2	0.260±.00	5.32±.19	7.84±.12
Birth type	0.168	.000	0.055	0.235	0.011	0.077	0.006
Single	2.81±.08	281.7±14.7	91.45±2.9	10.19±.3	0.332±.01	4.54±.23	7.00±.14
Twin	2.46±.13	445.7±23.7	107.50±4.5	11.25±.4	0.253±.01	5.70±.36	8.16±.22
Sex	0.033	0.925	0.204	0.026	0.042	0.735	0.918
Female	2.51±.17	368.7±28.2	96.50±5.7	10.14±.6	0.271±.01	5.11±.45	7.63±.28
Male	2.91±.18	369.1±30.4	103.32±6.1	11.55±.6	0.315±.02	5.26±.49	7.60±.30

BW: Birth weight; PW: Placental weight; CN: Cotyledon number; PE: Placental efficiency; CD: Cotyledon density; CE: Cotyledon efficiency; ACSA: Average cotyledon surface area.

Table 4 - Effect of parity, birth type and sex on cotyledon traits ($X \pm SE$).

	CNs	CNm	CNI	CNxL	CL (mm)	CWi (mm)	CDe (mm)
Mean	6.04±.7	69.60±2.8	23.4±2.2	0.35±.1	2.85±.05	1.97±.03	0.38±.01
Parity	0.303	0.789	0.383	0.120	0.229	0.213	0.237
2-3	7.23±1.3	68.46±5.0	26.3±3.9	0.02±.0	2.75±.09	1.91±.06	0.36±.02
≥4	4.85±.7	70.74±2.6	20.5±2.0	0.67±.1	2.94±.04	2.04±.03	0.40±.01
Birth type	0.414	0.400	0.001	0.277	0.009	0.006	0.086
Single	6.98±.8	73.21±3.0	11.0±2.3	0.12±.1	2.63±.05	1.82±.03	0.34±.01
Twin	5.10±1.2	65.99±4.8	35.8±3.7	0.57±.2	3.06±.08	2.13±.06	0.42±.02
Sex	0.513	0.051	0.192	0.404	0.760	0.839	0.593
Female	6.71±1.5	76.37±6.4	19.6±5.0	0.55±.3	2.84±.11	1.99±.08	0.37±.03
Male	5.39±1.4	65.54±5.9	25.2±4.7	0.34±.2	2.88±.10	1.98±.07	0.38±.02

CNs: Cotyledon number small (<10 mm diameter); CNm: Cotyledon number medium (between 10 and 30 mm diameter); CNI: Cotyledon number large (between 31 and 50 mm diameter); CNxL: Cotyledon number x large (>51 mm diameter); CL: Cotyledon length; CWi: Cotyledon width; CDe: Cotyledon depth.

dead kids and this difference was statistically very significant ($p<0.001$). In addition, PE was affected by the vitality of kids ($p<0.05$) and we observed that there was no CNxL in the dead kids. Even if it is not statistically significant, PW, CN, CNI, CL, CWi, Cde, CE and ACSA were higher in live kids than dead kids.

The mean BW, PW, CN, PE, CD, CE, and ACSA are determined to be $2.63\pm.08$ kg 363.7 ± 13.6 g, 99.48 ± 2.7 , $10.72\pm.2$, $0.292\pm.01$, $5.12\pm.21$ and $7.58\pm.13$ cm² respectively (Table 3). While parity and birth type are not effective on birth weight, sex affected birth weight. There are significant differences between parity and PW, CD ($P<0.05$). As the parity of the does rose, PW increased, but the CD decreased. Even if it is not significant, BW and ACSA increased and CN decreased with parity. Birth type affected PW ($p<0.001$), CD ($p<0.05$). Although the ACSA increased with the parity, this was not statistically significant.

In the study, it is determined that while single born goats have 281.7 ± 14.7 g placenta, twin born goats have 445.7 ± 23.7 g placenta. When we look at the kid sex, it can be seen that, it is affected by BW, PE, and CD ($p<0.05$). Otherwise, CN and CE are not affected by any factors. Effects of parity, birth type and sex on cotyledon traits were shown in Table 4. Although the parity and sex are important factors on many traits, we did not find any statistically significant effect parity and sex of

kids on the cotyledon traits. However, CNs was lower in ≥4 parity goats than 2-3 parity goats. Also, CNm, CNxL, CL, Cwi and CDe were highest in ≥4 parity goats.

On Table 5, we showed Pearson correlation coefficients of placental and cotyledon traits for hair goats. A positive correlation between BW and CL ($r=0.295$; $p<0.05$), CWi ($r=0.239$; $p<0.05$), PE ($r=0.428$; $p<0.01$), CE ($r=0.321$; $p<0.01$), ACSA (0.278 ; $p<0.05$) were calculated. As a matter of fact, while there was no significant correlation between the birth weight and the number of cotyledons in the correlation analysis, a very significant positive correlation between the birth weight and the number of long cotyledons has been determined. There was high positive correlation between ACSA and CL ($r=0.985$; $p<0.01$), CWi ($r=0.969$; $p<0.01$). However, a negative correlation between ACSA and CNs (-0.553; $p<0.01$), CD (-0.779; $p<0.01$) was determined for hair goats. There were positive correlation between parity and PW ($r=0.464$; $p<0.01$), CL ($r=0.434$; $p<0.01$), CWi ($r=0.408$; $p<0.01$), CDe ($r=0.383$; $p<0.01$) and ACSA ($r=0.432$; $p<0.01$).

DISCUSSION

The low placental and cotyledon characteristics of kids who died before weaning showed that placental and cotyledon

Table 5 - Pearson correlation coefficient of placental and cotyledon traits.

	Parity	BW	PW	CN	CNs	CNm	CNI	CNIx	CL	CWi	CDe	PE	CD	CE
BW	.032													
PW	.464**	.148												
CN	-.001	-.083	.297*											
CNs	-.317**	-.213	-.313**	.451**										
CNm	-.124	-.090	-.180	.596**	.437**									
CNI	.210	.067	.578**	.252*	-.284*	-.603**								
CNIx	.303*	.097	.372**	.000	-.294*	-.111	.152							
CL	.434**	.295*	.702**	-.023	-.623**	-.459**	.640**	.400**						
CWi	.408**	.239*	.689**	.049	-.424**	-.385**	.573**	.456**	.911**					
CDe	.383**	-.191	.354**	.355**	-.049	-.248*	.632**	.405**	.226	.283*				
PE	-.255*	.428**	-.226	-.135	-.134	-.107	.002	.200	.045	.109	-.086			
CD	-.524**	-.116	-.794**	.218	.633**	.536**	-.527**	-.403**	-.800**	-.708**	-.201	.203		
CE	.228	.321**	.547**	-.428**	-.497**	-.518**	.247*	.410**	.476**	.464**	.019	.385**	-.675**	
ACSA	.432**	.278*	.712**	.007	-.553**	-.438**	.626**	.433**	.985**	.969**	.255*	.073	-.779**	.481**

BW: Birth weight; PW: Placental weight; CN: Cotyledon number; CNs: Cotyledon number small (<10 mm diameter); CNm: Cotyledon number medium (between 10 and 30 mm diameter); CNI: Cotyledon number large (between 31 and 50 mm diameter); CNlx: Cotyledon number x large (>51 mm diameter); CL: Cotyledon length; Cwi: Cotyledon width; Cde: Cotyledon depth; PE: Placental efficiency; CD: Cotyledon density; CE: Cotyledon efficiency; ACSA: Average cotyledon surface area; *: P<0.05, **: P<0.01.

traits have an effect on kids' vitality. In our study, we found the result that kids' birth weight was lower than those of Yilmaz et al.¹⁶ (3.15 kg) and Celik Tozlu and Oflaz¹⁷ (3.7 kg) in the same breed. Also, when compared to other goat breeds, it has been observed that the result of birth weight were lower than Angora, Kilis, Honamli and Norduz which were reported by Daskiran et al.¹⁸

Our study gave an interesting finding in relation to ACSA which is that twins had more ACSA than singletons (p<0.01). Dwyer et al.¹⁹ and Ocak et al.²⁰ reported that birth type was effective on PW as same as this study. Also, PW as showed by some researchers^{12,14}, increased with the parity. While the CD decreases with the parity as Alkass et al.²¹, single born goats have higher CD than twin born goats similar to the result of the study by Ocak et al.²²

Cotyledon number is formed on the 30th day of pregnancy and there was no change in cotyledon number in the later periods although there was a change in size. Twins had more cotyledons than singletons. This situation is not in line with the results of past caprine studies of the findings of Ocak et al.²⁰ and Ocak et al.²², however it is in accordance with the ovine studies by Dwyer et al.¹⁹ and Jawasreh et al.²³ and the caprine study by Konyali et al.²⁴. Konyali et al.¹² reported that placental efficiency is an important element of uterine capacity. But it has been shown that variation in concepts within a litter was important for this feature, resulting in the conclusion that PE was an individual conceptual property^{22,25}. For this reason, it has been contended by Ocak et al.²² that CE was a much more precise and reliable measure of fetomaternal nutrition. In the study by Sen and Onder¹⁴, it was reported that the CE increased, PE decreased with the parity and it was statistically significant. Also, Ocak et al.²² reported that twins placenta had CE 4 times higher than the PE. Parity did not affect CL and CWi as reported by Ocak and Onder (2011)²⁶ which is different from our study. CNI, CL, and CWi were affected (p<0.01) by birth type and they were

higher in twin births compared to single births. A very important and noticeable result was that twin placentas had a higher number of CNI and bigger CL and CWi, (p<0.05) but fewer (p>0.05) numbers of CNs and CNm. This situation is an important indicator of the relationship between cotyledon size and fetus development.

There was already a higher correlation between placental weight and CNI than CN. This result showed us that only the number of cotyledons was not a sufficient parameter for the birth weight of the kids, thus the cotyledon length may be used as a parameter for bigger birth weight. The high correlation that we found between ACSA and BW, CL and CWi showed us that cotyledon sizes were a crucial parameter for lamb birth weight. Further studies should be carried out on the enlargement of the cotyledon dimensions in the prenatal period at the histological level and nutrition.

CONCLUSION

From this result, we suggested that CE was a much more precise and reliable measure of placenta functional ability. In our study, parity and birth type did not affect PE and CE. However, CE was highest in ≥4 parity and twins. The main reason for the difference between the results of other researchers and our study in parity could be that ACSA was not affected statistically by the parity and birth type. Because of the effects of cotyledon traits on birth type such as ACSA, new studies are needed to increase vitality and to reduce the death of kids by improving the nutrition of the prenatal period.

References

- Daskiran I., Ayhan Y. (2018). Some descriptive parameters and correlations between live weight and some body measurements of Kilis goats in semi-intensive conditions. J Tekirdag Agri Fac, 15:1: 51-56.

2. Atay O., Gökdal Ö., Eren V. (2010). Reproductive characteristics and kid marketing weights of Hair goat flocks in rural conditions in Turkey. Cuban J Agri Sci, 44 (4), 353-358.
3. Erten Ö., Yilmaz O. (2013). Investigation of survival rate and growth performances of hair goat kids raised under extensive conditions. Van Vet J, 24:3: 109-112.
4. Koyuncu E., Pala A., Savas T., Konyali A., Atasoglu C., Das G., Ersoy .E., Ugur F., Yurtman .Y., Yurt H.H. (2006). Technical analysis of the enterprises registered with the Canakkale sheep and goat association. J Anim Prod, 47: 21-27.
5. Dunlap K.A., Brown J.D., Keith A.B., Satterfield M.C. (2015). Factors controlling nutrient availability to the developing fetus in ruminants. J Anim Sci Biotech, 6:1: 16.
6. Wu G., Bazer F.W., Wallace J.M., Spencer T.E. (2006). Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. J Anim Sci, 84: 2316-37.
7. Wallace J.M., Bourke D.A., Aitken R.P., Palmer R.M., Da Silva P., Cruickshank M.A., (2000). Relationship between nutritionally-mediated placental growth restriction and fetal growth, body composition and endocrine status during late gestation in adolescent sheep. Placenta, 21, 100-108.
8. Shelton M. (1964). Relation of birth weight to death losses and to certain productive characters of fall-born lambs. J Anim Sci, 23: 355-9.
9. Redmer D.A., Wallace J.M., Reynolds L.P., (2004). Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. Domestic Anim Endocrinology, 27, 199-217.
10. Picciano M.F., (2003). Pregnancy and lactation: physiological adjustments, nutritional requirements and the role of dietary supplements. J Nutr, 133: 1997-2002.
11. Thomas D.M., Clapp J.E., Shernce S.A., (2008). Fetal energy balance equation based on maternal exercise and diet. J Royal Society Interface, 5: 449-55.
12. Konyali A., Tolu C., Das G., Savas T. (2007). Factors affecting placental traits and relationships of placental traits with neonatal behaviour in goat. Anim Reproduc Sci, 97, 394-401.
13. Ocak S., Ogun S., Gunduz Z. and Onder H. (2016). Goat placental efficiency determination by comparing litter weight to the surface area of the cotyledons. Anim Reproduc, 12(4), 920-926.
14. Sen U., Onder H. (2016). Poor placental traits reduce kid birth weight in young Saanen dams in the first parity. Turkish J Vet Anim Sci, 40(5), 554-561.
15. Ocak S., Ogun S., Onder H. (2013). Relationship between placental traits and maternal intrinsic factors in sheep. Anim Reproduc Sci, 139: 31-37.
16. Yilmaz O., Kucuk M., Bolacali M., Cak B. (2013). Investigation of survival rate, growth performance and some body measurements of Saanen x Hair goat F1 crossbred and pure Hair goat kids raised in semi-intensive conditions. Bulgarian J Agricultural Sci, 19: 835-840.
17. Celik H.T., Olfaz M. (2017). 6th month body measurements of Hair goat and Saanen x Hair (F1, B1 and B2) crossbred kids and determination of the factors affecting these measurements. Academic J Agriculture, 6:2: 161-168.
18. Daskiran I., Savas T., Koyuncu M., Kolumn N., Keskin M., Esenbuga N., Konyali A., Cemal İ., Gür S., Elmaz O., Kosum N., Della G., Bingöl M. (2018). Goat production systems of Turkey: Nomadic to industrial. Small Rumin Res, 163: 15-20.
19. Dwyer C.M., Calvert S.K., Farish M., Donbav J., Pickup H.E. (2005). Breed, litter and parity effects on placental weight and placentome number, and consequences for the neonatal behavior of the lamb. Theriogenology, 63, 1092-1110.
20. Ocak S., Emsen E., Koycegiz F., Kutluca M., Onder H. (2009). Comparison of placental traits and their relation to litter size and parity weight in sheep. J Anim Sci, 87(10), 3196-3201.
21. Alkass J.E., Merkhan K.Y., Hamo R.A.H. (2013). Placental traits and their relation with birth weight in Meriz and Black goats. J Anim Sci, 2(6), 168-172.
22. Ocak S., Ogun S., Gunduz Z., Onder H. (2014). Relationship between placental traits and birth related factors in Damascus goats. Livest Sci, 161, 218-223.
23. Jawasreh K.I.Z., Awawdeh F.T., Al-Khasawneh A.Z., Shdaifat B., Al-Shaboul H., Al-Hamed B. (2009). The effect of some placental factors in birth weight of Awassi lambs. Res J Anim Vet Sci, 4, 5-8.
24. Konyali A., Tolu C., Das G., Savas T. (2006). Der einfluss von geburt und neonatalem verhalten auf das wachstum bei turkischen saanen-lam mern. Züchtungskunde, 78, 230-240.
25. Wilson M.E., Ford S.P. (2001). Comparative aspects of placental efficiency. Reproduct Supplement, 58:223-232.
26. Ocak S., Onder H. (2011). Placental traits and maternal intrinsic factors affected by parity and breed in goats. Anim Reproduct Sci, 128, 45-51.

COMPRAVENDITA DI ATTREZZATURE PROFESSIONALI VETERINARIE

VET-EXCHANGE è il servizio telematico, libero e gratuito riservato ai soli medici veterinari. Questo servizio ha l'unico scopo di consentire un più facile contatto tra soggetti interessati alla compravendita di attrezzature professionali veterinarie. **Non è consentito l'accesso alle aziende del settore.**

Il portale registra più di 20.000 visite mensili, con una media di 200 annunci al mese.

Per inserire la propria offerta o richiesta è necessario la registrazione al servizio tramite un modulo on-line. Al termine della registrazione il sistema fornirà all'utente un codice che, insieme alla password, consentirà di accedere all'area riservata per modificare/integrare/cancellare la propria scheda prodotti e la scheda dati personali. Le inserzioni permangono in rete per 90 giorni; alla scadenza di questo periodo vengono rimosse automaticamente.

Registrazione e condizioni d'uso dettagliate al sito:
<http://www.vetexchange.it/>

 **VET-EXCHANGE**
IL MERCATO ITALIANO DELLE ATTREZZATURE
PROFESSIONALI VETERINARIE
Servizio on-line dell'A.N.M.V.I.

BOVIGEN®
SCOUR



Per bovine da
carne e da latte



One shot, one life

- Vaccino per l'enterite neonatale ad ampio spettro
- Vaccinazione primaria one shot
- Ampia finestra di vaccinazione: da 12 a 3 settimane prima del parto
- Adiuvante bifasico: rapida e persistente risposta immunitaria
- 3 anni di validità



Virbac S.r.l.

Via E. Bugatti, 15 - 20142 Milano

Tel. +39 02 4092471

it.virbac.com

virbac@virbac.it

Shaping the future
of animal health

Virbac

Preliminary results on antifungal activity of donkey milk



IOLANDA ALTOMONTE¹, SIMONA NARDONI¹, FRANCESCA MANCIANTI^{1,2}, STEFANIA PERRUCCI^{1,2}, ROSARIO LICITRA¹, FEDERICA SALARI¹, MINA MARTINI^{1,2}

¹ Department of Veterinary Science, University of Pisa, Italy

² Interdepartmental Research Center Nutrafood “Nutraceuticals and Food for Health”, University of Pisa, Italy

SUMMARY

Donkey milk is being increasingly studied for its use in the human medicine and its antimicrobial activity has been reported in the literature. However, there have been only few studies on milk's inhibiting activity against fungi. Donkey milk is currently used in the personal healthcare industry, thus evaluating its antifungal activity against some dermatophytes is of interest in relation to the natural prevention or control of dermatophyte infections. This preliminary study evaluated the *in vitro* antifungal activity of donkey milk. Four fresh pasteurized bulk milk samples were collected from a donkey farm. Pasteurized donkey bulk milk samples were analysed in relation to gross composition, individual mineral content (Ca, P, Mg, K, Na, and Zn mg/L), fatty acid profile, and lysozyme activity. The milk samples were tested against isolates of *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, and *Trichophyton mentagrophytes*. Sensitivity testing was assessed by a microdilution test, starting by a milk concentration of 90%. To calculate minimal inhibitory concentration values, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, and 10% dilutions were tested. Donkey milk was proven to inhibit mycotic growth. In particular, *M. canis* and *T. mentagrophytes* failed to grow in 60% donkey milk and *M. gypseum* appeared to be sensitive to 70%. The antidermatophyte effect could be related to the milk content of some fatty acids with reported antifungal activities. In the analysed donkey milk, C10:0 on average constituted 70% of the short chain fatty acids and the milk fat showed a relatively high content of linoleic and alpha linolenic acid (15.34 and 4.87 g/100 g of the total fatty acids respectively). We also found a high lysozyme activity (1402.50 U/mL of milk). In conclusion, donkey milk showed an overall *in vitro* antidermatophytic effect. On the basis of the promising results obtained in this preliminary report, further studies are needed to evaluate the *in vivo* use of donkey milk against dermatophytosis.

KEY WORDS

Donkey milk; fatty acids; antifungal activity; dermatophytes.

INTRODUCTION

Milk contains an overall pool of biologically-active molecules which have been shown to have a positive clinical impact¹. Donkey milk is being increasingly studied for its use in the human diet². Donkey milk has shown *in vitro* anti inflammatory, antiproliferative³ and antitumour actions⁴. In addition to its nutritional value, these properties would make donkey milk a means to improve human health. The antimicrobial activity of donkey milk was also reported⁵. Gram positive bacteria appeared to be more susceptible to lysozyme from milk, however different results have also been found against gram negative bacteria, in particular *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*^{6,7}, depending on the milk composition.

There have been only few studies on milk's inhibiting activity against fungi. To the best of our knowledge, the antifungal activity of donkey milk has been evaluated only against the endosaprophyte yeast *Candida albicans*, and the anthropophilic dermatophytes, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*⁵.

Dermatophytes are a group of keratinophilic and keratolytic molds, which are physiologically and taxonomically related, and are responsible for ringworm both in human and animals. Zoophilic dermatophytes spend their life on the animals' keratin and some species can metabolize human keratin, causing zoonotic diseases. Cats and lagomorphs are reservoir hosts of *Microsporum canis* and *T. mentagrophytes*, respectively. Other dermatophytes called geophilic, such as *Microsporum gypseum*, are also able to colonize and digest keratin on hair-baits in the soil. All the three fungal species are responsible for human and animal ringworm and can colonize the host skin or annexa.

Since donkey milk is also an essential component of many cosmetic products, the understanding of its antifungal activity against some dermatophytes is of interest, this could provide a natural way to prevent and/or control such human infections.

The aim of this preliminary study was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of pasteurized donkey milk.

MATERIALS AND METHODS

Four fresh pasteurized bulk milk samples were collected in September 2018 (once a week) from a farm rearing about 160 Amiatina donkeys. The farm produced pasteurized milk for

Corresponding Author:
Federica Salari (federica.salari@unipi.it).

human consumption in accordance with the requirements of Regulation (EC) No 853/2004. The samples were immediately cooled to 4°C and transferred to the laboratory. The chemical composition of each sample was analysed in triplicate. After drying and incineration, dry matter and ash were determined by the gravimetric determination of residues, using methods of the Association of Official Analytical Chemists⁸. Lactose was determined by infrared analysis (MilkoScan; Italian Foss Electric, Padova, Italy). Protein was calculated as total nitrogen (N) (determined by Kjeldahl method) multiplied by 6.38. Individual mineral content (Ca, P, Mg, K, Na, and Zn mg/L) was determined in all samples by atomic absorption spectroscopy and UV-visible spectroscopy according to Horwitz⁹ and Murthy and Rhea¹⁰. Milk fat extraction was performed following the Röse-Gottlieb method¹¹.

Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared using methanolic sodium methoxide according to Christie¹² and analysed by gas chromatography, as described by Martini *et al.*¹³. The lysozyme (LZ) activity was evaluated in each milk sample using a commercial fluorimetric method on a microplate (EnzChek Lysozyme Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The test uses a suspension of *Micrococcus lysodeikticus* labelled with fluorescein. This microorganism is sensitive to the lithic activity of LZ which leads to a variation in the intensity of the fluorescence measured at ~485/530 nm (excitation/emission). Milk was diluted and no defatting methods were used. The results were compared with an LZ standard curve and expressed in U mL⁻¹.

Three feline clinical isolates of *M. canis* and *M. gypseum*, respectively, and three rabbit isolates of *T. mentagrophytes* were selected for *in vitro* testing. Before the assay, the molds were maintained on Malt Extract Agar.

Sensitivity was assessed by a microdilution test, performed following the methods described by CLSI for molds¹⁴, starting by a milk concentration 90%. To calculate a minimal inhibitory concentration (MIC) value, dilutions of 80%, 70%, 60% 50%, 40%, 30%, 20%, and 10% were obtained. Negative controls were performed by incubating the dermatophytes in culture medium, and the sensitivity against Terbinafine was evaluated as conventional antimycotic model. All cultures were incubated at 25°C for at least 72 hours, or until a visible growth in control wells was present. All sensitivity tests were performed in quadruplicate.

For the results of the milk composition, means and standard deviations were calculated by JMP (2002).

RESULTS

The chemical composition and lysozyme activity of the analysed donkey milk are reported in Table 1. In the analysed donkey milk, C10:0 constituted on average 70% of the short chain fatty acids and the milk fat showed a relatively high content of linoleic and alpha linolenic acid (15.34 and 4.87 g/100 of the total fatty acids respectively). We also found a high LZ activity (1402.50 U/mL of milk).

All the fungal isolates were sensitive to Terbinafine with MIC values of 0.0156 µg/ml (*M. canis*), 0.16 µg/ml (*M. gypseum*), and 16 µg/ml (*T. mentagrophytes*). Donkey milk was proven to inhibit mycotic growth. In particular, *M. canis* and *T. mentagrophytes* failed to grow with a concentration of 60% donkey milk, and *M. gypseum* appeared to be sensitive to 70%.

DISCUSSION

The results on chemical composition and lysozyme activity were consistent with previous studies^{15,16}.

To the best of our knowledge, the only published paper dealing with the antifungal activity of donkey milk was the one by Koutb *et al.*⁵, who referred a minimal lethal concentration of 32 mg/ml against *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*, using a 50-fold concentrated milk, while no growth inhibition was observed, when testing *C. albicans*. The MIC value reported by us *versus* *T. mentagrophytes* appears to be strongly lower when compared to literature data. For the first time we tested the donkey milk activity against *M. canis* and *M. gypseum*. The content of various fatty acids with proven antifungal actions in the analysed donkey milk (Table 1) supports the

Table 1 - Chemical composition of the pasteurized milk.

Gross composition (g/100 mL)		
	Mean	SD
Dry matter	9.30	0.227
Crude Protein	1.54	0.079
Fat	0.33	0.193
Lactose	6.99	0.104
Ash	0.36	0.026
Mineral profile (mg/L)		
	Mean	SD
Ca	598.54	185.86
P	406.65	101.49
Mg	86.69	10.530
K	652.81	82.970
Na	171.77	46.095
Zn	3.29	1.017
Fatty acids classes (g/100 g of fat) and content of individual fatty acids with reported antifungal activity		
	Mean	SD
SFA ¹	51.69	10.065
MUFA ²	27.51	8.391
PUFA ³	20.59	2.977
SCFA ⁴	11.90	3.234
MCFA ⁵	42.02	6.845
LCFA ⁶	46.07	9.459
C10:0	8.39	2.572
C12:0	8.73	3.419
C14:1	0.37	0.130
C17:1	0.34	0.086
C18:2 c9, c12	15.34	4.001
C18:3 c9, 12, 15	4.87	1.454
C18:3 cis-6,9,12	0.08	0.02
	Mean	SD
Lysozyme activity (U/mL)	1402.50	286.65

¹ SFA: saturated fatty acids; ² MUFA: monounsaturated fatty acids;

³ PUFA: polyunsaturated fatty acids; ⁴ SCFA: short chain fatty acids (<C10);

⁵ MCFA: medium chain fatty acids (C11-C17);

⁶ LCFA: long chain fatty acids (>C18).

potential involvement in the inhibition of the tested fungal isolates. It has been hypothesized that fatty acids act against fungi by the disruption or disintegration of the plasma membrane^{17,18} or by increasing the rate of H⁺ influx across the plasma membrane, which could interfere with the germination¹⁹.

Bergsson *et al.*¹⁸ and Clément *et al.*¹⁹ highlighted the antifungal activity of capric acid (C10:0). They also found antifungal actions for myristoleic acid (C14:1n-5), and gamma-linolenic acid (C18:3 cis-6,9,12) from bovine milk whey¹⁹. Similar activities against plant pathogenic fungi have also been found for alpha linolenic (C18:3 c9, 12, 15) and linoleic acids (C18:2 c9, c12)²⁰. C10:0 constituted on average the 70% of the short chain fatty acids in the donkey milk analysed, in agreement with previous studies²¹. In addition, donkey milk fat showed a high content of linoleic and alpha linolenic acid. Of the various dairy animal milks, donkey milk has been reported to be one of the richest sources of alpha linolenic acid². With regard to C17:1, which is also found in the donkey milk, an antifungal action has been proposed¹⁷.

Some of the minerals found in donkey milk, such as zinc, are components of metal-based therapeutics and drugs²². Of these, Zn (II) complexes and zincum oxide nanoparticles have shown antifungal activities^{23,24}.

The literature²⁵ has reported the antibacterial activity of some milk bioactive proteins, such as LZ. Although there have been relatively few studies on the antifungal activity of LZ, some authors have found LZ lytic activity against fungal pathogens for animal and plants^{26,27}. Donkey milk also has a high quantity of LZ (about 1-1.5 g L⁻¹), which seems to be involved in its low bacterial count²⁸. In agreement with recent investigations [Martini *et al.*, unpublished data], we also found a high activity of LZ in the pasteurized milk.

The antifungal activity of lactoferrin or its peptides, in combination with azole antifungal agents, have also been demonstrated against *C. albicans* and dermatophytes²⁹. Furthermore, lactoferrin is a minor component (0.097-0.133 g L⁻¹) of donkey milk and has a poorer thermal resistance compared to LZ³⁰.

CONCLUSIONS

Donkey milk shows an overall antidermatophyte effect. This could be due to the synergistic action of fatty acids, lysozymes and other milk components.

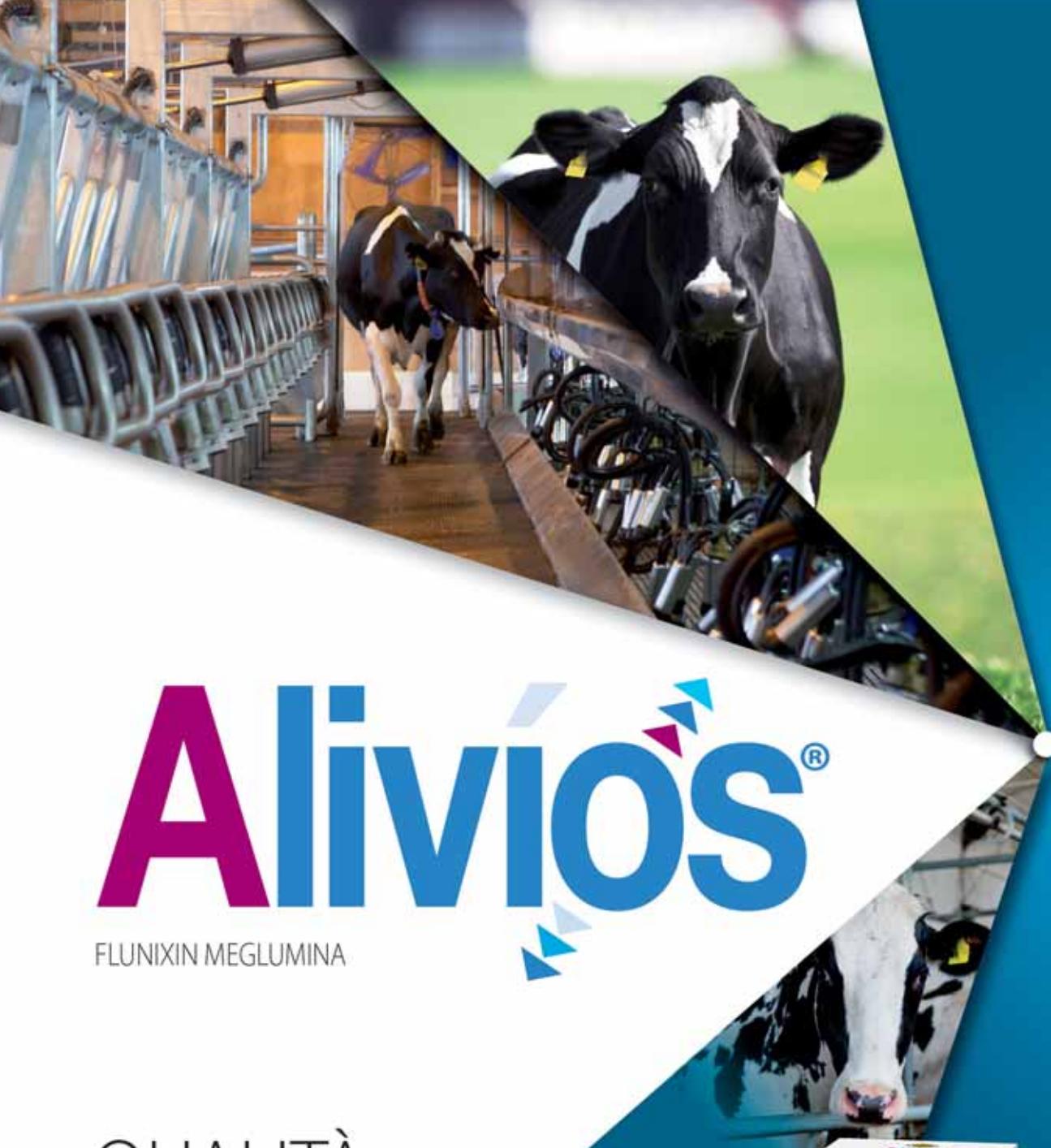
The results on mycotic growth inhibition obtained in this preliminary report are promising, considering also that cosmetic products containing 60-70% of donkey milk are already present on the market. Further studies are needed in order to evaluate the *in vivo* use of donkey milk against dermatophytosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the Complesso Agricolo Forestale Regionale Bandite di Scarlino, Scarlino, Italy. This work was supported by PRA 2017 (Ateneo Research Project, University of Pisa). Improvement of productive performance of dairy donkey n I52F17000260005.

References

- Hill D.R., Newburg, D.S. (2015). Clinical applications of bioactive milk components. Nutr Rev, 73:463-476.
- Martini M., Altomonte I., Licitra R., Salari F. (2018). Nutritional and Nutraceutical Quality of Donkey Milk. J Equine Vet Sci, 65: 33-37.
- Jirillo, E., Jirillo, E., Magrone, T. (2010). Donkey's and goat's milk consumption and benefits to human health with special reference to the inflammatory status. Current Pharmaceutical Design, 16: 859-863.
- Mao X., Gu J., Sun Y., Xu S., Zhang X., Yang H., Ren F. (2009). Anti-proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells. Int Dairy J, 19: 703-708.
- Koubt M., Khider M., Ali E.H., Hussein N.A. (2016). Antimicrobial Activity of Donkey Milk against Dermatomycotic Fungi and Foodborne Bacteria. International Journal of Biomedical Materials Research, 4: 11-17.
- Šarić L.Č., Šarić B.M., Mandić A.I., Torbica A.M., Tomić J.M., Cvetković D.D., Okanović D.G. (2012). Antibacterial properties of Domestic Balkan donkeys' milk. Int Dairy J, 25: 142-146.
- Šarić L.Č., Šarić B.M., Kravić S.đ., Plavšić D.V., Milovanović I.L., Gubić J.M., Nedeljković N.M. (2014). Antibacterial activity of Domestic Balkan donkey milk toward *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. Food and Feed Research 41: 47-54.
- AOAC International (1990). Official methods of analysis. 15th edition. AOAC International, Arlington, VA.
- Horwitz W. (2000). Official Method of Analysis of AOAC International. 17th edition. AOAC International, Gaithersburg, VA.
- Murthy G.K., Rhea U. (1967). Determination of major cations in milk by atomic absorption spectrophotometry. J Dairy Sci, 50: 313-317.
- AOAC International. (1995). Official Methods of Analysis. 16th edition. Vol. II. AOAC International, Arlington, VA.
- Christie W.W. (1982). A simple procedure of rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. J Lipid Res, 23: 1072-1075.
- Martini M., Altomonte I., Licitra R., Salari F. (2018). Short communication: Technological and seasonal variations of vitamin D and other nutritional components in donkey milk. J Dairy Sci, 101: 8721-8725.
- CLSI. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard 2nd edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, M38-A2.
- Martini M., Altomonte I., Salari F., Caroli A.M. (2014). Short communication: Monitoring nutritional quality of Amiata donkey milk: Effects of lactation and productive season. J Dairy Sci 97: 6819-6822.
- Ragona G., Corrias F., Benedetti M., Paladini I., Salari, F., Altomonte I., Martini M. (2016). Amiata donkey milk chain: animal health evaluation and milk quality. Ital J Food Saf, 5: 5951.
- Avis T.J., Bélanger R.R. (2001). Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9 heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. Appl Environ Microbiol, 67: 956-960.
- Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrimsson O., Thormar H. (2001). In vitro killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. Antimicrob Agents Chemother, 45: 3209-3212.
- Clément M., Tremblay J., Lange M., Thibodeau J., Belhumeur P. 2008. Purification and Identification of Bovine Cheese Whey Fatty Acids Exhibiting In Vitro Antifungal Activity. J. Dairy Sci, 91: 2535-2544.
- Walters D., Raynor L., Mitchell A., Walker R., Walker K. (2004). Antifungal Activities of Four Fatty Acids against Plant Pathogenic Fungi. Mycopathologia, 157: 87-90.
- Martini M., Salari F., Altomonte I., Ragona G., Piazza A., Gori R., Casati D., Brajon G. (2018). Effects of pasteurization and storage conditions on donkey milk nutritional and hygienic characteristics. J Dairy Res, 85: 445-448.
- Chohan Z.H. (2009). Metal-based antibacterial and antifungal sulfonamides: synthesis, characterization, and biological properties. Transit Metal Chem, 34: 153-161.
- Karimiyani A., Najafzadeh H., Ghorbanpour M., Hekmati-Moghaddam S.H. (2015). Antifungal Effect of Magnesium Oxide, Zinc Oxide, Silicon Oxide and Copper Oxide Nanoparticles Against *Candida albicans*. Zahedan. J. Res. Med. Sci., 17: 2179.
- Díaz J.R.A., Baldo M.F., Echeverría G., Baldoni H., Vullo D., Soria D.B., Supuran C.T., Camí G.E. (2016). A substituted sulfonamide and its Co (II), Cu (II), and Zn (II) complexes as potential antifungal agents. J Enzyme Inhib Med Chem, 31: 51-62.
- Brumini D., Criscione A., Bordonaro S., Vegarud G.E., Marletta D. (2016). Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: brief review. Dairy Sci Technol, 96: 11-14.
- Düring K., Porsch P., Mahn A., Brinkmann O., Gieffers W. (1999). The non-enzymatic microbial activity of lysozymes. FEBS Lett, 449: 93-100.
- Samaranayake Y.H., Samaranayake L.P., Pow E.H., Beena V.T., Yeung K.W. (2001). Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. J Clin Microbiol, 39: 3296-3302.
- Altomonte I., Salari F., Licitra R., Martini M. (2019). Donkey and human milk: Insights into their compositional similarities. Int Dairy J, 89: 111-118.
- Clare D.A., Swaisgood H.E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. J Dairy Sci, 83: 1187-1195.
- Ozturkoglu-Budak S. (2018). Effect of different treatments on the stability of lysozyme, lactoferrin and b-lactoglobulin in donkey's milk. Int J Dairy Technol, 71: 36-45.



Alivios®

FLUNIXIN MEGLUMINA

QUALITÀ

100% MADE IN ITALY

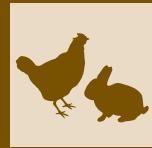


La salute animale per la salute dell'uomo

FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) - Tel. 051 6512711 - www.fatro.it - info@fatro.it



Pseudotubercolosi aviare in tacchini di un allevamento rurale della provincia di Chieti, Italia



**ELGA ERSILIA TIERI¹, MARIA ANTONIETTA SALETTI¹, ALESSANDRA CORNACCHIA¹,
GABRIELLA DI FRANCESCO¹, ANNA RITA D'ANGELO¹**

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario,
64100 Teramo, Italy

RIASSUNTO

La pseudotubercolosi è una malattia contagiosa degli animali domestici e selvatici causata da *Yersinia pseudotuberculosis*, che può colpire anche l'uomo. La trasmissione avviene attraverso l'ingestione di acqua o alimenti contaminati. Nei tacchini sporadici episodi di mortalità sono stati segnalati fin dai primi anni del 1900. Vista l'esiguità dei dati in letteratura, si descrivono le lesioni anatomo-patologiche ed istologiche osservate in tacchinotti (*Meleagris gallopavo*) nell'ambito di un focolaio in un allevamento rurale della provincia di Chieti. La moria dei volatili è stata osservata da novembre a gennaio: in questo periodo, sono morti circa 60 tacchini di sesso femminile di circa 5 mesi di età, su un totale di 105 (57,14%), introdotti in allevamento in agosto.

Gli animali mostravano debolezza, penne arruffate, difficoltà respiratoria, diarrea verdastra, perdita dell'appetito.

In sede necroscopica, in 5 esemplari esaminati, sono state rilevate splenite ed epatite con aree disseminate puntiformi biancastre di 1-2 mm di diametro. Le indagini istopatologiche hanno permesso di apprezzare le lesioni granulomatose ed estese aree di necrosi, in alcune delle quali erano evidenti aggregati batterici. Eguali focolai necrotici sono stati osservati microscopicamente anche nei reni e nei polmoni di 3 volatili.

Gli esami batteriologici hanno evidenziato la crescita di cocco bacilli gram negativi identificati come *Yersinia pseudotuberculosis*. Per ridurre il rischio di contagio tra i volatili allevati e gli animali portatori sani, è auspicabile in allevamento l'applicazione di misure sanitarie volte ad evitare il contatto tra loro e la contaminazione degli alimenti di uso zootecnico e l'acqua di bevanda.

PAROLE CHIAVE

Tacchino; splenite; epatite; granuloma; *Yersinia pseudotuberculosis*.

INTRODUZIONE

La pseudotubercolosi è una malattia contagiosa degli animali domestici e selvatici causata da *Yersinia pseudotuberculosis*, batterio ubiquitario che può colpire anche l'uomo, causando una grave enterite acuta con linfoadenopatia dei linfonodi mesenterici¹. La trasmissione avviene attraverso l'ingestione di acqua o alimenti contaminati. Diversi autori documentano che *Yersinia pseudotuberculosis* è veicolato nell'intestino di animali portatori sani, in particolare degli uccelli selvatici e dei roditori che sono in grado di provocare epidemie^{2,3}.

La pseudotubercolosi aviare è caratterizzata da una setticemia acuta di breve durata, seguita da infezioni croniche localizzate, che esitano in noduli caseosi simili ai tubercoli della tubercolosi⁴.

Sporadici episodi di mortalità sono stati segnalati nei tacchini in Germania e Francia fin dai primi anni del 1900, come riportato nella sintesi di Beaudette⁵. Successivamente sono stati riportati rari focolai negli Stati Uniti^{6,7,8,9} in Inghilterra^{10,11} e in Germania¹². Vista l'esiguità dei dati in letteratura, si descrivono le lesioni anatomo-patologiche ed istologiche osservate in tacchinotti nell'ambito di un focolaio in un allevamento della provincia di Chieti.

MATERIALI E METODI

Nel periodo novembre-gennaio, in un allevamento rurale per l'ingrasso della provincia di Chieti sono morti circa 60 tacchini di sesso femminile, ibridi del Bronzato d'America, di circa 5 mesi di età, su un totale di 105 (57,14%), introdotti in allevamento in agosto. Gli animali mostravano debolezza, penne arruffate, difficoltà respiratoria, diarrea verdastra, perdita dell'appetito con morte a circa due settimane dall'inizio della sintomatologia.

L'allevatore non aveva osservato in precedenza questi segni clinici negli animali del suo allevamento.

Le galline ovaiole allevate nella stessa azienda non mostravano nessuna sintomatologia.

I tacchini si muovevano liberamente dalla stalla alle aree aperte recintate e l'allevatore non disponeva di un piano di controllo dei pests, nonostante avesse rilevato la presenza dei roditori nella sua azienda nelle aree di ricovero e in quelle di stoccaggio e somministrazione dei mangimi e foraggi.

Le carcasse di 5 dei volatili, in scadente stato di nutrizione, sono state conferite all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" per accertamenti atti a determinarne la causa di morte.

Il fegato, la milza, il rene e i polmoni sono stati flammati, tagliati con coltello e posti in un brodo di arricchimento costituito da acqua peptonata; successivamente i brodi sono stati seminati su agar sangue, Mc Conkey agar e agar mannite e

Corresponding Author:
Elga Ersilia Tieri (e.tieri@izs.it).

posti a 37°C. Le colonie sviluppatesi a 24-48 ore sono state sottoposte a test di conferma mediante colorazione di Gram, test dell'ossidasi e della catalasi e infine sottoposte ad identificazione biochimica mediante sistema miniaturizzato API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), metodo più sensibile tra i sistemi miniaturizzati in commercio¹³. È stata inoltre testata la sensibilità del batterio isolato ai farmaci antimicrobici amoxicillina, colistina, enrofloxacin, neomicina, sulfametazolo + trimethoprim, tetraciclina, con l'esecuzione dell'antibiogramma mediante il metodo della diffusione su piastra di Bauer¹⁴.

I diametri degli aloni di inibizione sono stati misurati ed i risultati sono stati valutati nelle categorie "sensibile", "intermedio" e "resistente", utilizzando i limiti di attività del germe pubblicati dalle ditte produttrici dei dischetti utilizzati per l'antibiogramma (Oxoid e BD BBL™) e presenti nella guida per *Enterobacteriaceae* del "Clinical and Laboratory Standards Institute"¹⁵.

I tessuti, inviati per le indagini microscopiche, sono stati fissati in formalina neutra tamponata e processati in paraffina. Le sezioni di tessuto sono state colorate con Ematossilina-Eosina, Ziehl-Neelsen per la ricerca di bacilli alcool acido resistenti e con la colorazione di Perls per l'evidenziazione dei depositi di emosiderina.

RISULTATI

In sede necroscopica, in tutti gli animali sono stati rilevati l'aumento di volume del fegato e dei reni, l'enterite catarrale con il contenuto intestinale di colore verdastro e la presenza di splenite ed epatite con aree disseminate puntiformi biancastre di 1-2 mm di diametro. In due esemplari è stata rilevata la presenza di aree di polmonite e di materiale caseoso giallastro nei sacchi aerei addominali ed in un solo esemplare l'edema gelatinoso del grasso pericardico.

Le indagini istopatologiche hanno evidenziato lesioni riferibili ad un'infezione batterica cronica. Lesioni multifocali miliari hanno interessato il fegato, la milza, i polmoni ed i reni. È stato possibile identificare tre tipi di lesioni di contemporanea localizzazione. Lesioni allo *stadio iniziale* (*small lesions*) con evidenti aggregati batterici (Figura 1, A-B), lesioni in *stadio intermedio* (*intermediate lesions*) con aree centrali eosinofliche amorfe, che sostituivano le colonie batteriche, delimitate da infiltrato di granulociti neutrofili (Figura 2, A-B), ed infine lesioni allo *stadio di grandi granulomi* (*large granulomas*) con grandi cellule giganti (Figura 3, A-B-C-D). La Ziehl-Neelsen non ha evidenziato in alcun caso germi alcool acido resistenti e la colorazione di Perls ha messo in luce rari depositi di emosiderina solo nel fegato (Figura 4).

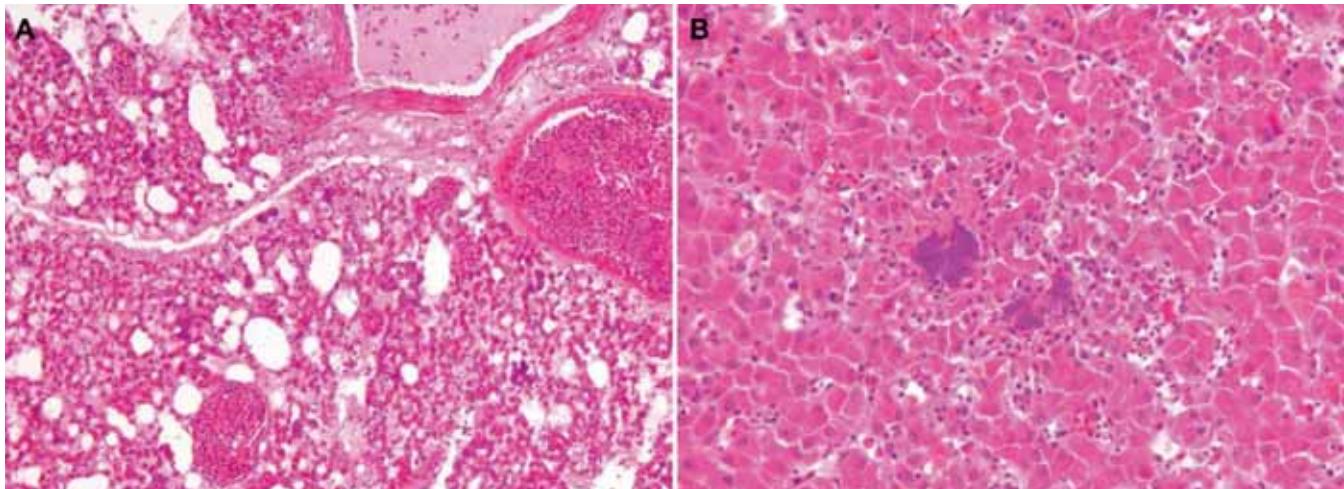


Figura 1 - Lesioni istologiche nello stadio iniziale (*small lesions*). Colonne di batteri. **A)** Polmone (Ematossilina Eosina 20x). **B)** Fegato (Ematossilina Eosina 40x).

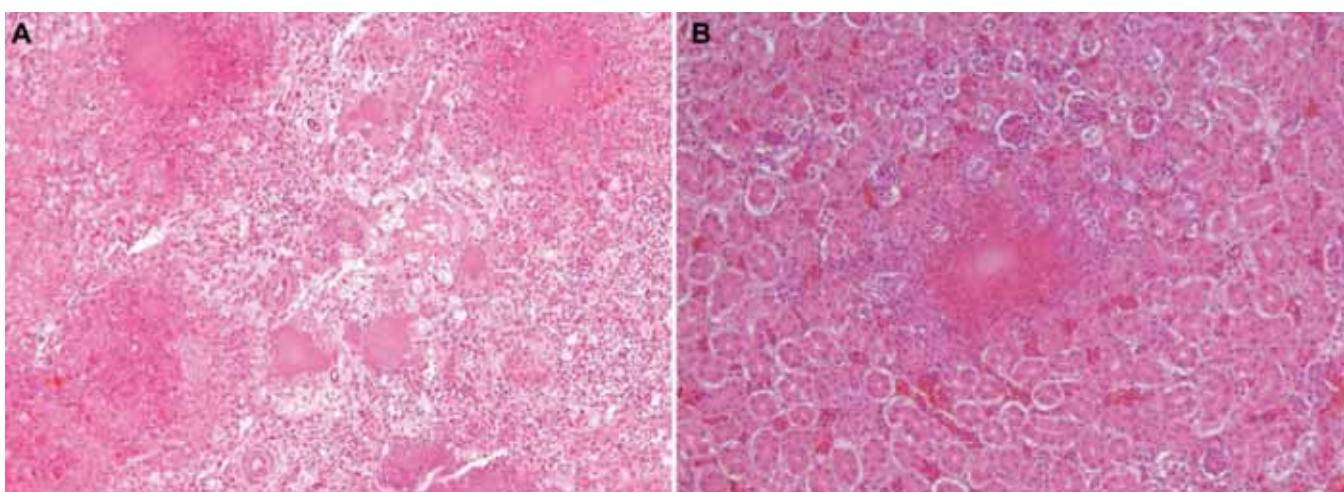


Figura 2 - Lesioni istologiche nello stadio intermedio (*intermediate lesions*). Ampie aree di necrosi, delimitate da granulociti neutrofili, contenenti aggregati batterici. **A)** Milza (Ematossilina Eosina 20x). **B)** Rene (Ematossilina Eosina 20x).

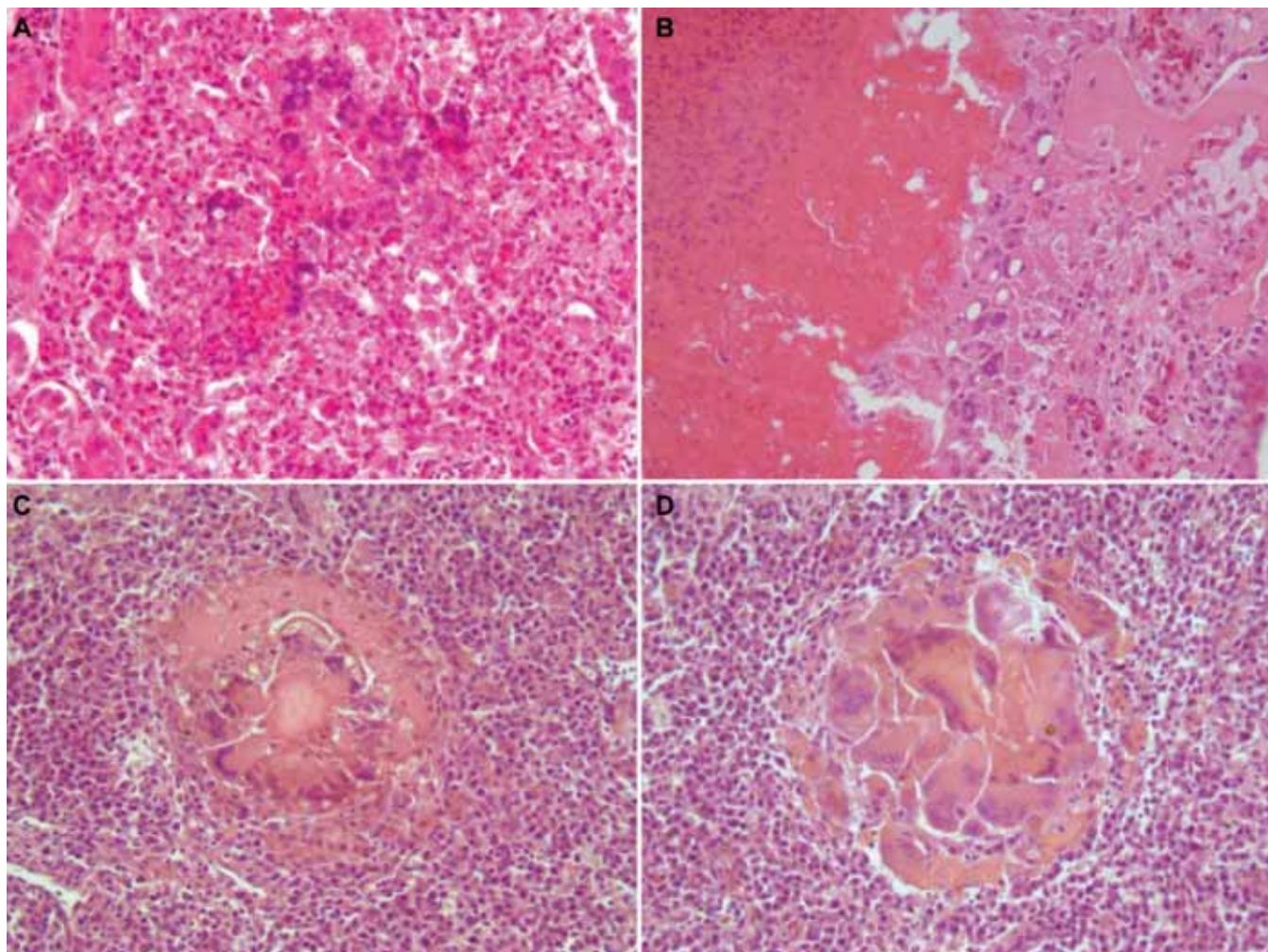


Figura 3 - Lesioni istologiche nello stadio di grandi granulomi (large granulomas).

- A) Rene. Reazione granulomatosa caratterizzata da cellule giganti multinucleate nei lumi dei tubuli degenerati (Ematossilina Eosina 20x).
- B) Polmone. Reazione granulomatosa con area di necrosi delimitata da cellule giganti multinucleate (Ematossilina Eosina 40x).
- C, D) Milza. Reazione granulomatosa a differenti stadi di evoluzione (Ematossilina Eosina 40x).

L'esame batteriologico ha evidenziato, su agar sangue, la crescita a 24-48 ore in aerobiosi a 37°C di piccole colonie di 1-3 mm di diametro, di colore grigio e non emolitiche, incolori su Mc Conkey agar. Il batterio è stato caratterizzato come coccobacillo Gram negativo, ossidasi negativo, catalasi positivo; il sistema API 20E lo ha identificato come *Yersinia pseudotuber-*

culosis e tra gli antibiotici saggiati è risultato sensibile a diverse molecole (Tabella 1). I restanti tacchini dell'allevamento sono stati quindi sottoposti ad un trattamento terapeutico con tetracicline che ha permesso l'estinzione del focolaio.

DISCUSSIONE

Il rilievo di aree biancastre puntiformi disseminate nel fegato e nella milza sono state già documentate in precedenza in alcuni focolai di pseudotuberculosis nei tacchini in Francia⁵, in Inghilterra¹⁰ e negli Stati Uniti⁹ mentre erano assenti in altri in Germania⁵, negli Stati Uniti^{6,7} e in Inghilterra¹¹.

Le lesioni macroscopiche renali riportate nei volatili esaminati furono riscontrate in passato in un focolaio descritto in Francia⁵, mentre quelle polmonari non sono state finora osservate.

A differenza di quanto riportato da alcuni Autori^{9,11,12}, nei tacchini esaminati non sono state osservate lesioni riferibili ad osteomielite delle ossa lunghe, né a miopatia degenerativa.

Le lesioni istologiche sono sovrapponibili a quelle di tipo 2 osservate da Cork nei piccioni e nei pappagalli¹⁶, associate ad un decorso cronico della pseudotuberculosis, ad eccezione dei depositi di emosiderina che nel nostro caso sono risultati di lieve entità.

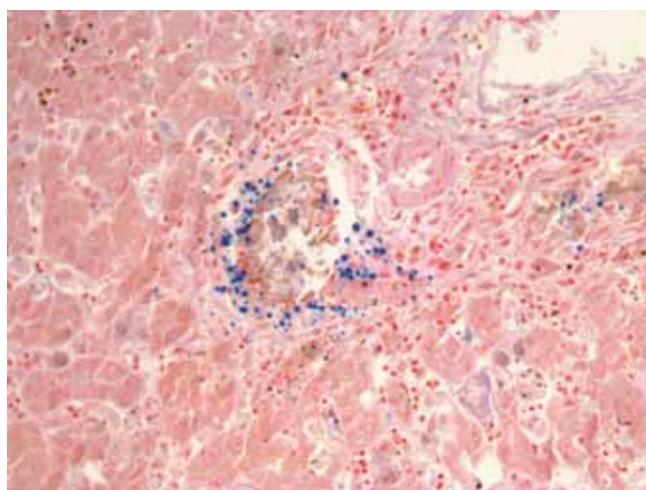


Figura 4 - Fegato. Granuli di emosiderina colorati in blu e delimitati i depositi di materiale necrotico (Perls 40x).

Tabella 1 - Risultati della sensibilità di *Yersinia pseudotuberculosis* ai farmaci antimicrobici saggiati.

Antibiotico saggiato	Categorie	Diametro degli aloni di inibizione (mm)	Breakpoint tra la categoria S ed I e la categoria R ed I ¹⁵		
			R	I	S
Amoxicillina 10 µg	S	24	≤ 13	14-16	≥ 17
Enrofloxacin 5 µg	S	23	≤ 16	17-22	≥ 23
Sulfametoxazolo + Trimethoprim 23.75/1.25 µg	S	28	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetraciclina 30 µg	S	22	≤ 11	12-14	≥ 15

S = sensibile, I = intermedio, R = resistente.

L'assenza di sintomatologia nelle galline ovaiole allevate con tacchini affetti da pseudotubercolosi fu segnalato in passato in un focolaio della Germania del 1924 nella sintesi di Beaudette⁵.

CONCLUSIONI

Vista la valenza zoonosica di *Yersinia pseudotuberculosis*, le persone a contatto con gli animali infetti dovrebbero prestare la massima attenzione ed usare tutte le precauzioni per non infettarsi. Per ridurre il rischio di contagio tra i volatili allevati e gli animali portatori, è auspicabile in allevamento l'applicazione di misure sanitarie volte ad evitare il contatto tra loro e la contaminazione degli alimenti di uso zootecnico e l'acqua di bevanda.

■ Avian pseudotuberculosis in backyard turkeys in the province of Chieti, Italy

SUMMARY

Introduction - Pseudotubercolosis is a contagious disease of domestic and wild animals caused by *Yersinia pseudotuberculosis*, which can affects humans.

Aim - Since only limited data about turkeys infected by *Yersinia pseudotuberculosis* can be found in literature, we will be describing the anatomo-pathological lesions and histopathological results observed in turkeys (*Meleagris gallopavo*) during an outbreak occurred in a flock in the province of Chieti. The disease in affected turkeys was characterized by debility, ruffled feathers, dyspnea, diarrhea, anorexia and death in about two weeks from the beginning of the clinical symptoms.

Materials and methods - The outbreak took place between November and Januar; in this period, 60 female turkeys about five months old died out of the total of 105 (57.14%) that had been put into the flock in August.

Turkeys were free to move by stable to open area paddock and farmer didn't use a pests control plan, even if he noticed the presence of roditors in his farm.

At necropsy, in 5 carcasses examined, splenitis was observed and hepatitis with multifocal white protuberant foci of 1-2 mm in diameter both in kidneys and in lungs.

Results and conclusions - The histopathological tests indicated granulomatous lesions and extensive areas of tissue necrosis, in some of them bacterial agglomerates were present. Similar areas of tissue necrosis were observed microscopically in the kidneys and lungs of 3 turkeys.

The bacteriological test carried out on liver, spleen, kidney and lungs showed the growth of Gram-negative coccobacil-

lus, oxidase-negative, catalase positive and the API 20E system identified the isolate as *Yersinia pseudotuberculosis*.

The isolate showed to be sensitive to some antimicrobials, the animals therefore have been subjected to a therapeutic treatment with tetracyclines which ended the outbreak.

Yersinia pseudotuberculosis can infect human beings and cause acute enteritis and mesenteric lymphadenitis. People in contact with infected animals should use extreme caution and adopt all possible healthcare measures to prevent this agent from being transmitted.

In order to reduce the risk of infection between bred birds and healthy carrier animals, it is advisable adopt in the farm sanitary measures aimed at preventing contact between them and at avoiding contamination of foodstuff and drink water.

KEY WORDS

Turkey; splenitis; hepatitis; granuloma; *Yersinia pseudotuberculosis*.

Bibliografia

1. Weber J., Finlayson N.B., Mark J.B.D. (1970). Mesenteric lymphadenitis and terminal ileitis due to *Yersinia pseudotuberculosis*. N. Engl. J. Med. 283:172-174.
2. Mair N.S. (1973). Yersiniosis in wildlife and its public health implications. J. Wildlife Dis. 9:64-71.
3. Harcourt-Brown N.H. (1978). *Yersinia pseudotuberculosis* infection in birds. Veterinary Record, 102:315.
4. Rimler R.B., Glisson J.R. (2001). Pseudotubercolosi. In Calnek B.W, 2001. Patologia aviaria, 349-354, Piccin Nuova Libraria Padova.
5. Beaudette F.R. (1940). A case of pseudotubercolosis in a blackbird. J. Am. Vet. Med. Assoc. 97:151-157.
6. Kilian J.G., Yamamoto R., Babcock W.E., Dickinson E.M. (1962). An unusual aspect of *Pasteurella pseudotuberculosis* in turkeys. Avian Dis, 6:403-405.
7. Mathey W.J., Siddele P.J. (1954). Isolation of *Pasteurella pseudotuberculosis* from a California turkey. J.Am.Vet.Med.Assoc., 125:482-483.
8. Rosenwald A.S., Dickinson E.M. (1944). A report on *Pasteurella pseudotuberculosis* infection in turkeys. Am J. Vet. Res. 5:246-249.
9. Wallner-Pendleton E., Uppal P.K. (1983). Several outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* in California turkey flocks. Avian Dis., 27:524-526.
10. Blaxalnd J.D. (1947). *Pasteurella pseudotuberculosis* infection in turkeys. Vet. Rec. 59:317-318.
11. Wise D.R., Uppal P.K. (1972). Osteomyelitis in turkeys caused by *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Med. Microbiol. 5: 128-130.
12. Hinz K.H., Kaleta E.F., Stiburek B., Glunder G., Tessler K. (1981). Eine durch *Yersinia pseudotuberculosis* bei Mastputzen verursachte Myopathie. Dtsch.Tierarztl.Wochenschr., 88:352-354.
13. Neubauer H., Sauer T., Becker H., Aleksic S., Meyer H. (1998). Comparison of systems for identification and differentiation of species within the genus *Yersinia*. J. Clinical Microbiology, 36:3366-3368.
14. Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C., Turck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am.J. Clin. Pathol., 45:493-496.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 22st informational supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. Vol. 32, no.3. 44-49.
16. Cork S.C., Collins-Emerson J.M., Alley M.R., Fenwick S.G. (1999). Visceral lesions caused by *Yersinia pseudotuberculosis*, serotype II, in different species of bird. Avian Pathology, 28:393-399.

Interazione tra PCV2 e sistema immunitario. Cosa è cambiato dopo l'introduzione della profilassi vaccinale



GIULIA D'ANNUNZIO, FABIO OSTANELLO, GIUSEPPE SARLI

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

RIASSUNTO

Le malattie da PCV2 (*porcine circovirus diseases* - PCVD) sono una delle cause più importanti di perdite economiche nell'allevamento intensivo del suino. PCV2 causa sia forme cliniche sistemiche (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* - PMWS), sia forme localizzate di tipo enterico, respiratorio, dermatitico-nefritico e riproduttivo. PCV2 è anche responsabile di forme subcliniche di infezione che, tuttavia, provocano ritardo dell'accrescimento, aumento del numero degli scarti e della suscettibilità ad altre infezioni. Per questi motivi, il controllo dell'infezione da PCV2 è una priorità a livello internazionale. Negli ultimi anni, la disponibilità di vaccini sicuri ed efficaci ha permesso di ridurre l'incidenza e la gravità delle forme cliniche, in particolare della PMWS, di incrementare la produttività degli animali in accrescimento e migliorare i parametri produttivi delle scrofe. Tuttavia, nonostante i successi della vaccinazione, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da PCV2, ed il virus continua a circolare anche nelle aziende che usano piani di profilassi indiretta. I vaccini attualmente disponibili non sono infatti in grado di prevenire le infezioni subcliniche che rappresentano attualmente il problema sanitario principale. Anche in assenza di forme cliniche, l'infezione da PCV2 causa alterata funzione delle cellule produttrici di interferone naturale (NIPC) e conseguente riduzione della produzione di TNF- α e IFN- α e ripercussioni sulla funzione linfocitaria. La modificazione dell'equilibrio tra citochine pro-infiammatorie, pro-immuni e regolatorie che si concretizza nella sovraregolazione dell'IL-10 e sottoregolazione di IFN- γ , provoca inefficiente innesco di una adeguata risposta pro-infiammatoria innata, compromissione del riconoscimento delle infezioni virali e batteriche e compromissione delle risposte specifiche delle cellule T e B. A causa di questa particolare interazione tra PCV2 e sistema immunitario, che esita in una forte compromissione delle difese innate e adattative, le infezioni subcliniche possono essere responsabili di gravi conseguenze economiche. Tale compromissione delle difese innate e adattative spiega inoltre il ruolo svolto da PCV2 nelle coinfezioni. La vaccinazione anti-PCV2 può quindi, indirettamente, migliorare lo stato sanitario anche nei confronti di altri agenti patogeni riducendo, ad esempio, l'incidenza del complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC). Inoltre, nelle aziende in cui vi è la contemporanea circolazione di PCV2 e PRRSV, la vaccinazione contro PCV2 aumenta l'efficacia del vaccino anti-PRRSV. Lo studio e la comprensione dell'interazione tra PCV2 e sistema immunitario e dei meccanismi alla base dello sviluppo di una risposta immunitaria protettiva, sono i necessari presupposti per la sperimentazione di nuove formulazioni vaccinali. L'obiettivo per il prossimo futuro sarà quello di rendere disponibili dei vaccini che siano in grado di ridurre non solo l'espressione clinica delle PCVD ma che possano garantire anche una significativa riduzione della prevalenza di infezioni subcliniche, apendo così la strada alla concreta possibilità di eradicazione di PCV2 dalle aziende suinicole.

PAROLE CHIAVE

Suino; PCV2; PCVD; sistema immunitario; vaccinazione.

INTRODUZIONE

L'infezione da PCV2 è associata a numerose manifestazioni patologiche del suino denominate, nel loro complesso, *porcine circovirus diseases* (PCVD). Le PCVD (Figura 1) possono essere classificate in forme sistemiche, quali la sindrome del deperimento post-svezzamento (*post-weaning multisystemic wasting syndrome* - PMWS) o in forme localizzate quali enterite granulomatosa, sindrome dermatite-nefrite (*porcine dermatitis and nephropathy syndrome* - PDNS), forme respiratorie riconducibili alla *porcine respiratory disease complex* (PRDC), polmonite proliferativa e necrotizzante (*proliferative and necrotising pneumonia* - PNP) e di-

sordini riproduttivi caratterizzati da aborti e da interruzioni precoci della gravidanza¹. La PMWS, che rappresenta la forma clinica maggiormente conosciuta tra le PCVD è diventata, nel corso degli anni, un significativo problema sanitario ed economico per l'industria suincola a livello mondiale¹. La PMWS interessa principalmente i suinetti tra le 5 e le 15 settimane di età ed è caratterizzata da ritardi di accrescimento, dispnea, linfoadenomegalia dei linfonodi inguinali superficiali. PCV2 è costantemente rilevato in vari organi e tessuti dei suini con PMWS ed è costantemente presente nelle lesioni microscopiche tipiche della PMWS. Tuttavia, l'infezione da PCV2 non necessariamente causa patologie cliniche e anticorpi specifici anti-PCV2 sono stati rilevati in un'alta percentuale di sieri suini in tutto il mondo². L'infezione subclinica è quindi un evento frequente e può comunque causare ripercussioni negative sull'economia dell'allevamento provocando un aumento del numero di scarti, della percentuale di animali sottopeso e ri-

Corresponding Author:
Giuseppe Sarli (giuseppe.sarli@unibo.it).

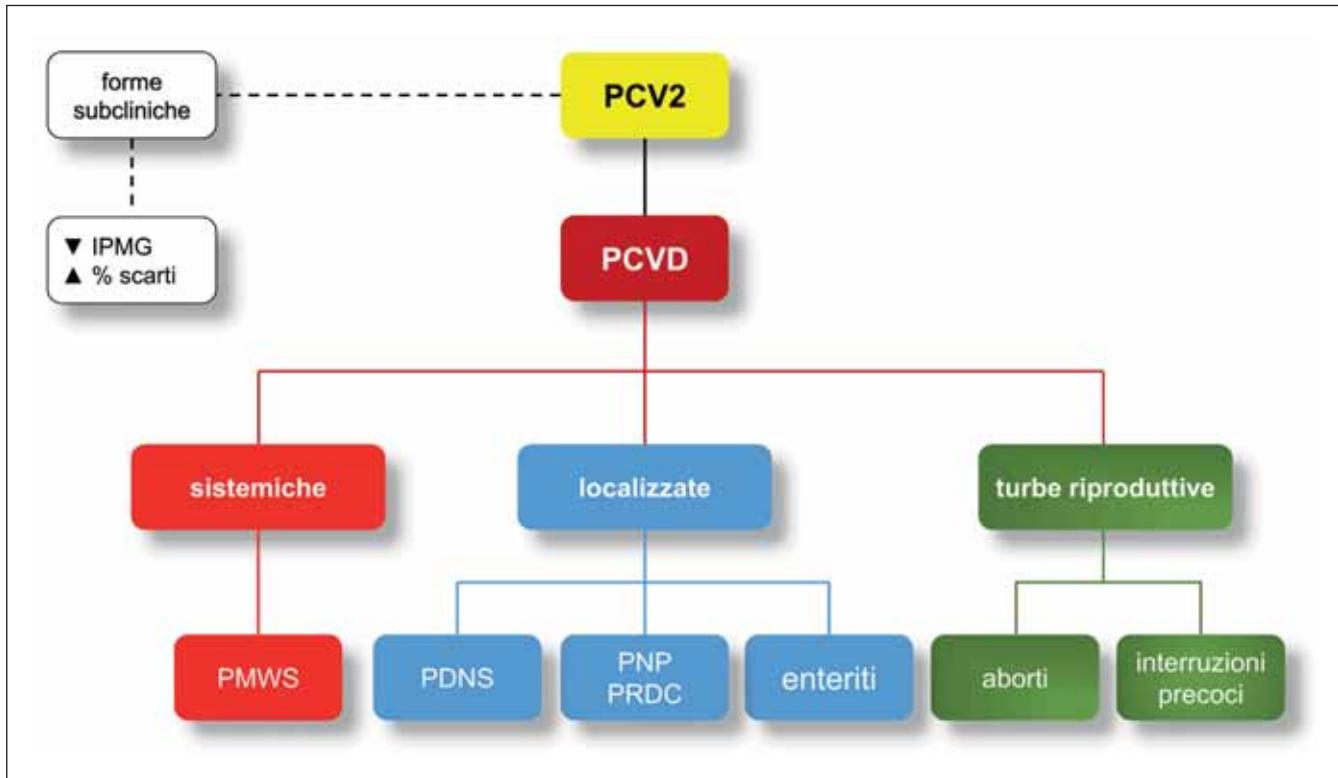


Figura 1 - Rappresentazione schematica delle porcine circovirus diseases (PCVD).



Figura 2 - L'eterogeneità dell'accrescimento nei gruppi, con aumento del numero dei soggetti sottopeso, può essere uno dei sintomi di inffezione subclinica da PCV2.

ducendo gli incrementi ponderali¹ (Figura 2). Anche se i postulati di Koch sono stati soddisfatti per quanto riguarda la relazione tra PCV2 e PMWS, è difficile riprodurre sperimentalmente la grave espressione clinica della malattia che si osserva in situazioni di campo³. In maniera analoga, anche la valutazione sperimentale delle possibili conseguenze sanitarie e/o economiche di forme subcliniche di infezione risulta difficile da realizzare. Tutto ciò rappresenta un limite alle valutazioni di efficacia dei vaccini che si basano generalmente anche sulla stima della riduzione di incidenza delle forme cliniche. PCV2 è considerato uno dei patogeni virali economicamente più importanti in tutti i Paesi maggiori produttori di suini. Di conseguenza, il controllo delle infezioni da PCV2 è una priorità a livello internazionale e numerose strategie di management, corretta gestione delle condizioni ambientali dell'allevamento e vaccinali sono at-

tualmente impiegate per ottenere il controllo delle forme cliniche e per ridurre la prevalenza di infezione. Tra i diversi metodi di profilassi, la vaccinazione è diventata uno strumento di primaria importanza. A partire dal 2004, in Europa e dal 2006 negli USA, sono stati commercializzati numerosi vaccini per la prevenzione delle PCVD e tutti sono allestiti con ceppi appartenenti al genotipo PCV2a, il genotipo prevalente fino ai primi anni 2000 e progressivamente sostituito dal genotipo PCV2b. Nel corso degli anni sono stati identificati, anche retrospettivamente, 4 ulteriori genotipi (c-f) di importanza clinica inferiore e/o con una circolazione limitata solo ad alcuni Paesi.

Prove di challenge⁴ hanno dimostrato che la vaccinazione riduce sensibilmente sia l'entità e la durata della viremia, sia l'entità e la durata dell'escrezione virale per via nasale o fcale, con il risultato di ridurre la carica virale nell'ambiente e

quindi il rischio di trasmissione dell'infezione. In condizioni di campo, tutti i vaccini anti-PCV2 attualmente disponibili sono inoltre in grado di ridurre la mortalità e la percentuale di scarti e migliorano significativamente l'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG)⁵⁻⁹.

Nonostante i successi della vaccinazione, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da PCV2: i vaccini attualmente disponibili non inducono un'immunità protettiva nei confronti dell'infezione e il virus continua a circolare anche nelle aziende che praticano la vaccinazione. In condizioni di campo il problema che rimane è quindi quello dell'insorgenza di infezioni subcliniche che possono causare, oltre alla riduzione delle *performances* produttive, anche immunodepressione.

Uno dei potenziali limiti dei vaccini commerciali è riconducibile alla diversità genetica tra i ceppi di PCV2 con cui sono stati allestiti e quelli attualmente circolanti nelle popolazioni suine, che fanno ipotizzare una possibile fuga immunitaria indotta dal vaccino. Allo stesso modo, la diversa formulazione dei vaccini disponibili rende complessa una valutazione omogenea della loro efficacia, laddove si riscontrano differenze quantitative nell'induzione dell'immunità cellulo-mediata e umorale tra le diverse tipologie di vaccini registrati per l'uso sui suinetti.

A causa delle modalità di trasmissione di PCV2 e della dinamica di popolazione delle aziende suinicole, che continuamente rinnovano il pool della popolazione sensibile attraverso movimentazioni di animali tra i diversi compartimenti, PCV2 è in grado di essere mantenuto in allevamento per anni senza necessità di reintroduzione. La vaccinazione intensiva rimane quindi uno strumento fondamentale per il controllo delle PCVD, contribuendo alla riduzione della frequenza di infezione, migliorando i parametri produttivi e conferendo indirettamente protezione anche nei confronti di altri agenti patogeni: l'effetto immunosoppressivo di PCV2 causa infatti una forte soppressione della funzionalità di base dei meccanismi di difesa innata predisponendo a superinfezioni secondarie e opportunistiche.

In questa *review* vengono sintetizzate le conoscenze relative all'interazione tra PCV2 e sistema immunitario e su come questa possa influenzare la risposta vaccinale nei confronti di PCV2 o di altri patogeni del suino. Vengono inoltre discusse le modificazioni, nel tempo, delle forme di PCVD confrontando la situazione precedente all'introduzione della vaccinazione con quella attuale che ne prevede l'impiego.

PATOGENESI DELL'IMMUNODEFICIENZA INDOTTA DA PCV2

Gli organi target di PCV2 sono i tessuti linfoidi, in cui la replicazione del virus può portare all'atrofia follicolare con conseguente deplezione linfocitaria e sostituzione con cellule istiocitarie, e conseguente effetto immunosoppressore¹⁰ (Figura 3). Studi istologici, condotti mediante tecniche immunoistochimiche per classificare i diversi fenotipi cellulari presenti a livello di tessuti linfoidi e verificare le variazioni nel meccanismo patogenetico dell'immunosoppressione da PCV2, hanno evidenziato che i cambiamenti più rilevanti sono rappresentati da: riduzione dei linfociti B e T, aumento del numero dei macrofagi e perdita parziale e ridistribuzione delle cellule presentanti l'antigene (APC)¹¹.

Le APC, in particolare le cellule dendritiche (Figura 4), giocano un ruolo chiave nella risposta immunitaria innata e adattativa. Le cellule dendritiche interdigitanti, site nei diversi tessuti dell'organismo, esprimono recettori di superficie in grado di riconoscere la presenza di agenti patogeni e rispondere mediante la produzione ed il rilascio di citochine antivirali come l'interferone tipo 1. Inoltre, migrano nella regione T-dipendente dei tessuti linfoidi dove presentano l'antigene alle cellule T, inducendone l'attivazione. Nei centri germinativi dei tessuti linfoidi sono invece presenti le cellule dendritiche follicolari, in grado di fagocitare gli antigeni circolanti e di presentarli ai linfociti B, determinandone l'attivazione e, di conseguenza, lo sviluppo dell'immunità umorale.

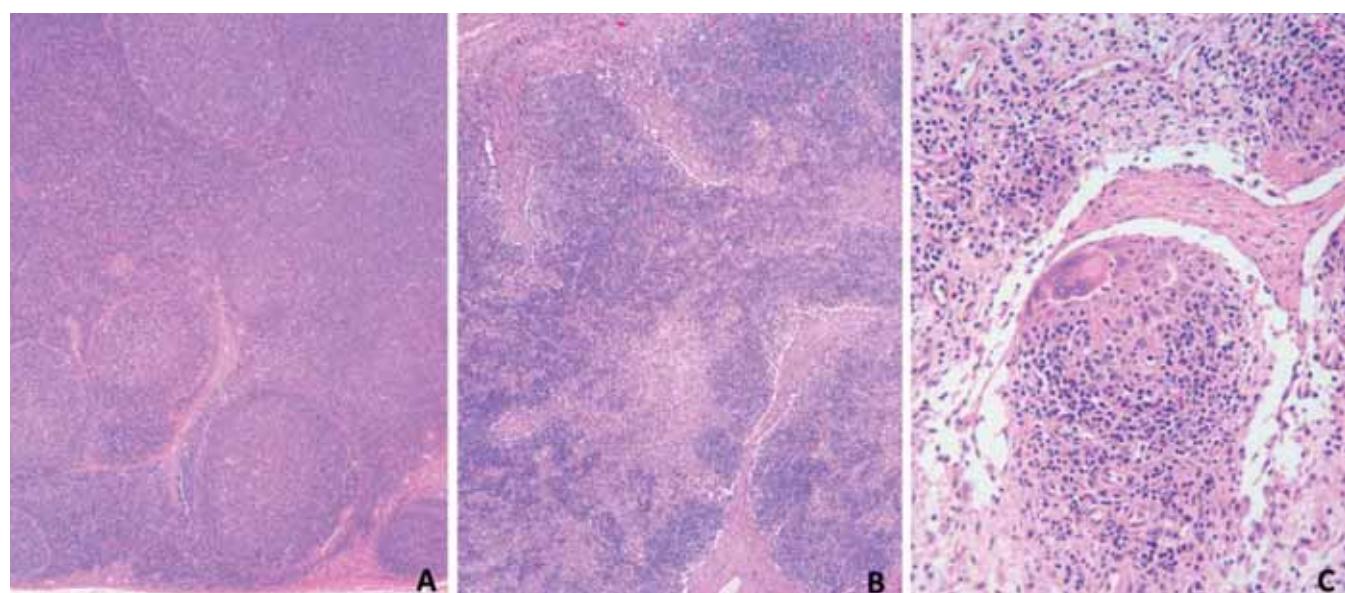


Figura 3 - In (A) linfonodo normostrutturato con follicoli reattivi e tessuto interfollicolare entrambi ben popolati di linfociti. La deplezione linfocitaria (B) con scomparsa dei follicoli e riduzione numerica dei linfociti del tessuto interfollicolare è la base istologica della immunodeficienza in corso di PMWS. Lesioni specifiche granulomatose (C) insieme alla deplezione linfocitaria rappresentano un altro aspetto tipico della PMWS. (A) 5x; (B) 5x; (C) 20x.

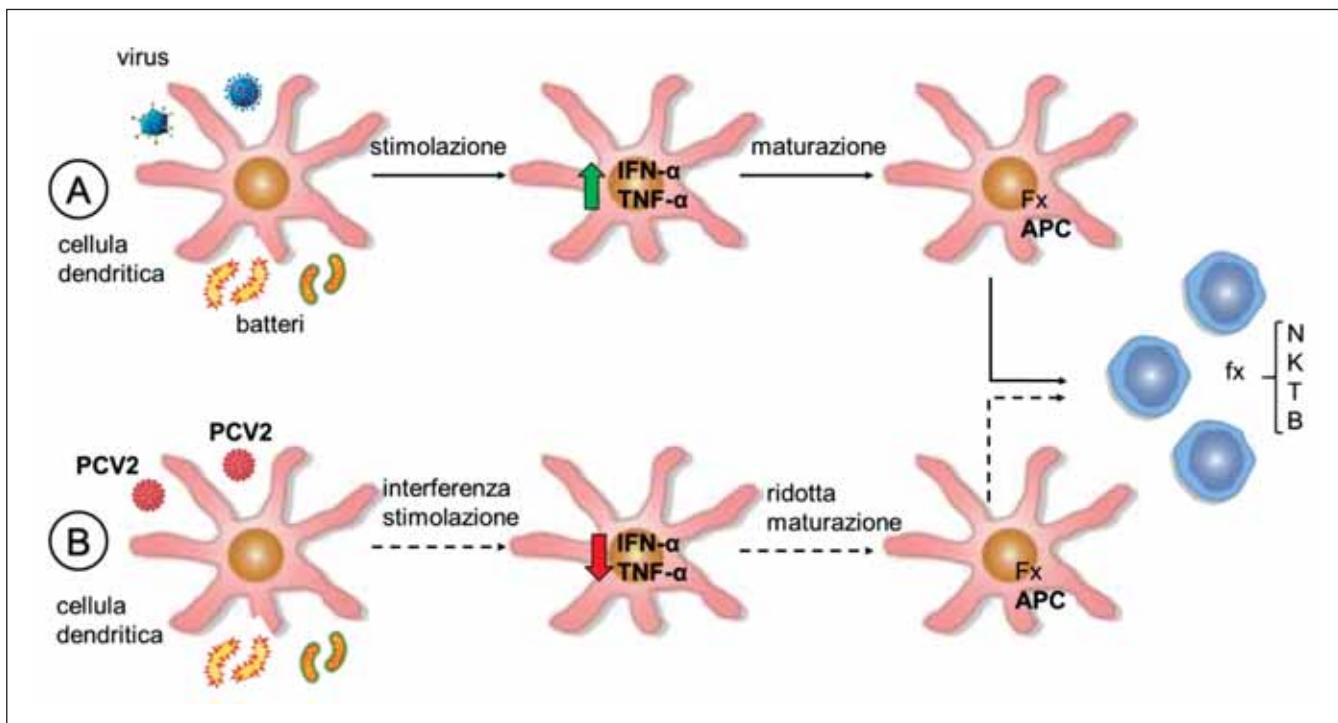


Figura 4 - Meccanismo cellulare dell'immunodeficienza indotta da PCV2.

Il meccanismo cellulare dell'immunodeficienza da PCV2 ha la sua massima espressione nella deplezione linfocitaria che origina a livello di cellule dendritiche (**A**), appartenenti al sistema immunitario deputate, in risposta a stimuli antigenici di natura virale o batterica recepiti prevalentemente con il sistema dei recettori Toll-simili, a produrre citochine (TNF- α e IFN- α) che, con meccanismo autocircolante potenziano la propria funzione di presentazione degli antigeni ai linfociti di cui stimolano la funzione. (**B**) In corso di infezione da PCV2, il DNA virale interferisce con i recettori Toll-simili indebolendo il processo di maturazione della funzione di presentazione dell'antigene e, di conseguenza, la funzione dei linfociti.

Più di un meccanismo risulta quindi essere coinvolto nel determinare l'azione immunosoppressiva di PCV2. Nei compartimenti linfoidi si rileva una riduzione dell'abilità nella presentazione dell'antigene, espressa dalla riduzione nel numero delle cellule dendritiche follicolari e delle cellule interdigitanti, associata ad una riduzione della funzione delle cellule B e delle cellule T CD4+ (*T helper*) nelle fasi iniziale e intermedia di infezione. Nella fase finale si arriva ad avere una prevalenza della componente stromale¹².

La deplezione delle cellule dendritiche follicolari nei suini colpiti da PMWS va di pari passo con la gravità della deplezione linfocitaria e con l'infiltrazione di macrofagi e cellule multinucleate a livello follicolare¹³.

Negli animali infetti da PCV2 è stata osservata anche una deplezione dei linfociti T CD8+ (linfociti T citotossici) e la quantità di DNA virale presente nei tessuti linfoidi, oltre a essere correlata alla deplezione linfocitaria nei tessuti, è correlata alla diminuzione di IgM+ e cellule CD8+ nel sangue periferico, a supporto dell'ipotesi che i soggetti infetti presentino una risposta immunitaria compromessa¹⁴. Il meccanismo coinvolto nella genesi della deplezione linfocitaria sembra essere associato ad una riduzione della proliferazione cellulare, più che ad un effettivo ruolo diretto di PCV2 nell'induzione di apoptosi delle cellule linfatiche¹⁵. Tuttavia, il meccanismo mediante il quale PCV2 determina tale deplezione e linfadenopatia deve ancora essere chiarito in modo definitivo¹⁰.

PCV2 è comunemente associato a cellule del lignaggio monocitico-macrafago e alle cellule dendritiche (DC); queste cellule accumulano l'antigene ed il DNA virale per periodi prolungati in assenza di un'efficiente replicazione virale. Ciò suggerisce che tali cellule abbiano un ruolo importante nella

persistenza, diffusione e trasmissione virale¹⁶. Sperimentalmente, è stato osservato che PCV2 è in grado di infettare cellule di origine epiteliale, endoteliale e mieloide coltivate *in vitro*, e ciò spiega la diffusa distribuzione del virus nei diversi tessuti. Nelle cellule dendritiche di derivazione mieloide prevalgono processi endocitici, importanti per l'internalizzazione e l'accumulo delle proteine virali, mentre a livello di cellule endoteliali ed epiteliali avvengono processi di avvio del ciclo replicativo¹⁷.

La presenza di PCV2 nelle DC non influenza la funzionalità delle DC mieloidi, ma è stata osservata immunomodulazione delle DC plasmacitoidi (pDC). Le cellule dendritiche plasmacitoidi, anche denominate cellule produttrici di interferone naturale (NIPC), hanno un ruolo fondamentale nell'immunità innata e adattativa. Sono cellule "sentinella": avvertono la presenza di "intrusi" e modellano la forza, la durata e la qualità delle risposte delle cellule *natural killer* (NK), T e B. Le NIPC rispondono in modo efficiente e rapido alle infezioni producendo quantità particolarmente elevate di interferone di tipo 1 (IFN) attraverso il riconoscimento di componenti batteriche e virali tramite recettori di riconoscimento, compresi i recettori toll-like (TLR). Alcuni autori^{18,19} hanno dimostrato che l'attività immunomodulatoria di PCV2 risulta essere mediata dall'interruzione della funzione delle NIPC attraverso l'interazione del DNA virale con i TLR endosomiali, con conseguente inibizione della produzione di IFN- α e del TNF- α , che dovrebbero essere prodotti dalle pDC. Ciò comprometterebbe la maturazione della DC mieloide associata e la successiva presentazione efficiente dell'antigene, con conseguenti importanti implicazioni per il riconoscimento dei segnali di pericolo virali e batterici. In stu-

di successivi, il DNA di PCV2 ha dimostrato di avere elevata capacità immunomodulatoria anche nei confronti delle stesse DC mieloidi interferendo con i processi endocitici, determinando quindi riduzione dell'efficienza di internalizzare le proteine virali PCV2-like²⁰. In definitiva, le difese innate dipendenti da TNF- α e IFN- α , come gli effetti antivirali diretti, la maturazione delle DC, l'attivazione delle cellule NK e la promozione di specifiche risposte delle cellule T e B, in caso di infezione da PCV2 sembra diventino inefficienti o inefficaci. Con l'incapacità delle NIPC di produrre IFN- α e TNF- α , il funzionamento efficiente delle DC mieloidi si deteriorebbe a causa del ruolo delle NIPC nel collegare l'immunità innata e quella adattativa¹⁹. La forte soppressione della funzionalità di base dei meccanismi di difesa innata è pienamente compatibile con l'osservazione di una maggiore frequenza di infezioni secondarie e opportunistiche nei suini colpiti da PMWS²¹.

In condizioni di campo, la sieroconversione avviene sia nei suini affetti da forme sistemiche sia in quelli che presentano infezione subclinica²² ed è stato dimostrato sperimentalmente che una risposta umorale ritardata o bassi titoli anticorpali specifici sono correlati all'espressione della forma clinica²³. Tuttavia, studi sperimentali e di campo hanno dimostrato che PCV2 può persistere nei tessuti e nel sangue anche in presenza di elevati titoli anticorpali, probabilmente a causa del fatto che non avviene una completa neutralizzazione del virus²⁴. Questi risultati spiegherebbero la lunga persistenza di PCV2 nel sangue e nei tessuti nonostante la presenza di anticorpi specifici nel siero²⁵. In condizioni sperimentali, anticorpi neutralizzanti (NA) sono rilevabili tra i 10 e i 28 giorni post infezione e la loro comparsa coincide con una diminuzione della carica virale sierica; titoli di NA bassi sono invece stati correlati all'aumento della replicazione di PCV2 e allo sviluppo di forme sistemiche. Tuttavia è stato osservato che non tutti i suini con basso titolo di NA hanno anche bassi livelli di anticorpi totali anti-PCV2^{26,27}. Quest'evidenza suggerisce che alcuni animali possano sviluppare una risposta umorale priva di NA o che gli NA vengano prodotti più tardi. Probabilmente la sola presenza di anticorpi non garantisce completamente la *clearance* virale e nel controllo dell'infezione gioca un ruolo importante anche la risposta immunitaria cellulo-mediata²⁵. Nei casi naturali di infezione da PCV2 si ritiene che la *clearance* virale sia mediata dalla combinazione tra presenza di NA e immunità cellulo-mediata. La differenza immunologica maggiore tra suinetti sintomatici e animali con infezione subclinica è la bassa o ritardata produzione di NA, insieme al riscontro di alti livelli di IL-10 e ridotta produzione di IFN- γ nei soggetti che presentano i segni clinici della malattia^{21,28}.

Per la risoluzione efficace di un'infezione è necessaria l'attivazione efficiente dell'immunità innata/infiammatoria e acquisita per bloccare la replicazione e l'invasione degli agenti patogeni, nonché per promuovere la *clearance* dei patogeni e/o delle cellule infette. La produzione di citochine pro-infiammatorie (IL-1b, TNF- α , IL-8) e l'equilibrio tra citochine pro-immuni (IFN- γ) e regolatorie (IL-10) svolgono un ruolo fondamentale nell'innescare la risposta innata, così come nell'innescare e coordinare la risposta immunitaria adattativa²⁹. Da numerosi studi è emerso che l'infezione da PCV2 altera in modo significativo le risposte delle citochine nei suini infetti: la citochina IL-10 è sovraregolata, mentre l'espressione di IL-2, IL-4 e IFN- γ è sottoregolata nei suini che ma-

nifestano PCVD, indicando un pattern alterato di risposta dei linfociti^{6,21}. IL-10 è una citochina regolatoria considerata un mediatore immunosoppressivo e antinfiammatorio. Inibisce la funzione dei macrofagi e può inibire la sintesi di citochine pro-infiammatorie come IFN- γ , IL-2, TNF- α . Durante l'infezione da PCV2 e in corso di PCVD, IL-10 è secreta principalmente da macrofagi-monociti e cellule dendritiche, ma anche da cloni di cellule T, che sono stati alterati dalla stimolazione prolungata dell'antigene³⁰. Suini con forme subcliniche sviluppano un aumento transitorio della risposta IL-10 durante il picco della viremia; al contrario, è dimostrato che negli animali con forme cliniche questa citochina predomina ancora nelle fasi successive. Sembra quindi che la risoluzione dell'infezione da PCV2 sia correlata al cessare delle risposte IL-10 specifiche, che coincide con l'inversione del rapporto IgM/IgG³¹. L'immunosoppressione mediata dall'IL-10 sembra quindi avere un ruolo importante nella patogenesi e nel mantenimento dell'infezione naturale da PCV2²¹ (Figura 5).

Nel corso di studi *in vitro* da campioni di sangue eparinizzato per l'isolamento delle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), è stata riscontrata, in concomitanza all'aumento dell'IL-10, una sovraespressione dell'mRNA di molecole immunomodulatorie PD-L 1 e 2 (*programmed death domain ligands*). Questo potrebbe essere alla base di una risposta inefficace delle cellule T, causando una diminuita risposta cellulo-mediata con conseguente aumento della gravità della malattia osservata negli animali con PCVD^{32,33}. L'attivazione dell'immunità cellulo-mediata, compresa la produzione di IFN- γ si è dimostrata necessaria per il controllo dell'infezione da PCV2^{34,35}: i suini che non producono livelli sufficienti di IFN- γ presentano livelli più bassi di NA e livelli più elevati di viremia associati a forme cliniche³⁵. L'ipotesi relativa all'importanza dello sviluppo di un'immunità cellulo-mediata protettiva deriva anche da dati di confronto tra animali vaccinati e animali affetti da PMWS: gli animali con PMWS non sono in grado di innescare un'efficace risposta pro-infiammatoria innata per far fronte all'infezione, come dimostrato dai bassi livelli di citochine pro-infiammatorie IFN- γ , IL-8, TNF- α e IL-1b, che si mostrano invece aumentate negli animali vaccinati^{28,29}.

L'immunodepressione causata da PCV2, combinata con l'influenza della natura cronica dell'infezione che va ad inficiare l'efficienza immunitaria degli animali infetti, può influenzare le risposte all'immunizzazione e la gravità delle coinfezioni¹. L'infezione con il solo PCV2 raramente evolve in malattia clinica; lo sviluppo di PCVD è spesso accelerato nell'insorgenza, potenziato in gravità e prolungato nella durata da infezioni virali o batteriche concomitanti: le coinfezioni possono promuovere l'infezione da PCV2 aumentandone la replicazione nei tessuti e l'accumulo nelle cellule del sistema immunitario dell'ospite³⁶.

Dopo le prime coinfezioni sperimentali con altri comuni patogeni suini, è stato dimostrato che, oltre all'immunosoppressione, anche l'immunostimolazione può innescare la progressione dell'infezione fino alla comparsa di malattia e lesioni caratteristiche. L'inoculazione di suinetti gnotobiotici con PCV2 associato ad immunostimolazione con emociana e adiuvante incompleto di Freund ha consentito la riproduzione sperimentale della PMWS³⁷. A seguito dei risultati di questo lavoro, si è sviluppata una notevole preoccupazione sul potenziale effetto sinergico dei vaccini adiuvati nei con-

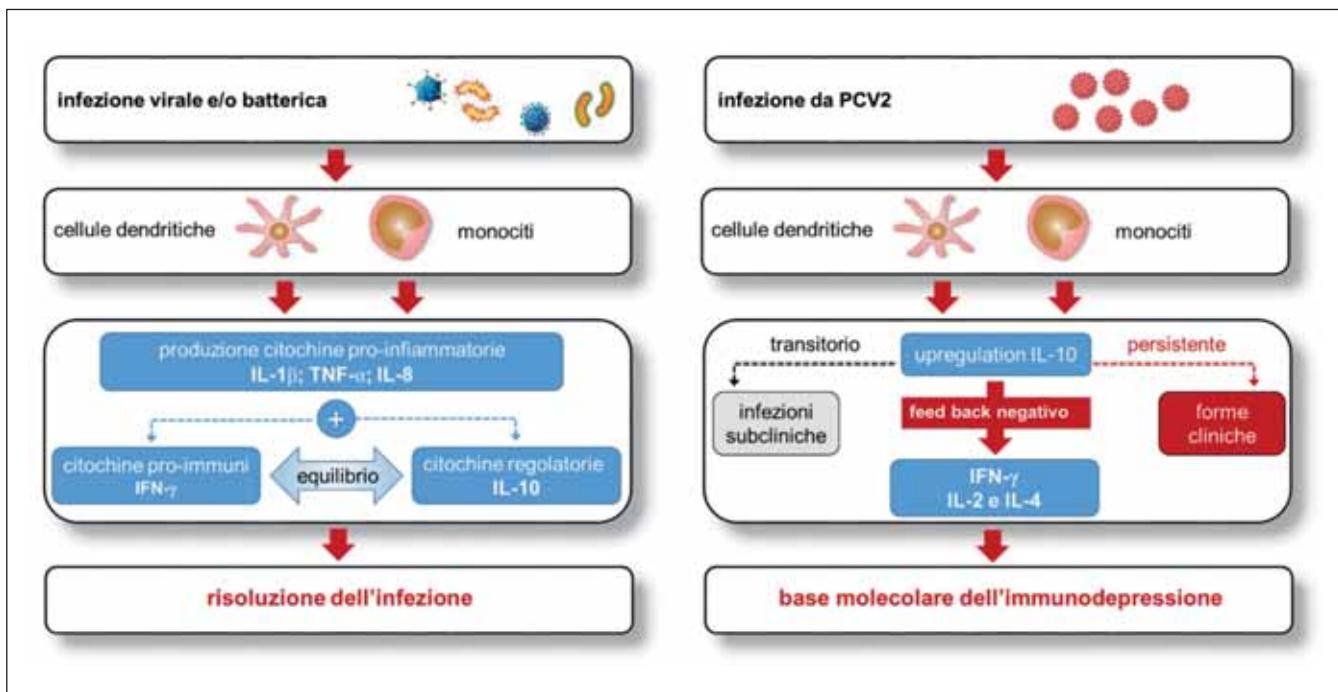


Figura 5 - Evoluzione della normale risposta infiammatoria post infezione e meccanismo dell'immunodepressione a seguito di infezione da PCV2.

A sinistra: cocktail citochinico alla base della risoluzione positiva della risposta infiammatoria ad una infezione virale o batterica che avviene grazie ad una produzione di citochine pro-infiammatorie e ad una equilibrata sintesi di citochine che esaltano la risposta immunitaria (IFN- γ) e quelle ad effetto regolatorio-anti infiammatorio e immunosoppressivo come l'IL-10.

A destra: situazione che si realizza in caso di infezione da PCV2 nel corso della quale è centrale l'upregulation della citochina IL-10 (evento transitorio nelle infezioni subcliniche, e persistente nelle forme cliniche di PCVD) che riduce la produzione di citochine ad effetto trofico positivo sulle cellule implicate nella risposta immunitaria.

fronti dell'infezione da PCV2. Per verificare questa ipotesi, è stato condotto uno studio per determinare se e quali tra gli adiuvanti presenti nei vaccini commerciali potessero indurre una maggiore replicazione di PCV2 e un'aumentata incidenza di PCVD. In questo studio i suinetti sono stati vaccinati a 4 e 6 settimane d'età ed infettati con PCV2 a 6 settimane d'età. In condizioni sperimentali, è stato rilevato che a 35 giorni post infezione, i suini ai quali è stato somministrato un vaccino adiuvato olio-in-acqua presentavano una maggiore durata della viremia, maggiore quantità di PCV2 nel siero e nei tessuti e un aumento della gravità della deplezione linfoidi rispetto ai suini ai quali era stato somministrato un vaccino adiuvato con carbopol in soluzione acquosa e con idrossido d'alluminio³⁸.

INFEZIONE DA PCV2 PRIMA DELLA PROFILASSI VACCINALE

PCV2 è un virus ubiquitario, che causa un'infezione persistente² e viene costantemente rilevato in secreti ed escreti a seguito di infezione naturale o sperimentale. Sia le aziende colpite da PMWS che quelle non colpite presentano un tasso d'infezione e di sieroconversione simile³⁹.

PCV2 si diffonde rapidamente, per via orizzontale e verticale, all'interno della popolazione suina. Il contatto diretto è la modalità di trasmissione più efficace a causa dell'esposizione contemporanea dei suini recettivi alle secrezioni respiratorie, alla saliva, feci e urina contaminate. La trasmissione tra aziende avviene mediante l'introduzione di animali vivi o prodotti (es. sperma) infetti. A causa delle numerose vie di

trasmissione e del continuo *turnover* della popolazione recettiva, l'infezione viene mantenuta in allevamento per anni⁴⁰. È stato inoltre chiaramente messo in evidenza che la coinfezione con *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) causa una maggiore durata e quantità di eliminazione di PCV2, determinando una maggiore contaminazione dell'ambiente con un conseguente aumento del rischio di infezione⁴¹.

PCV2 è resistente alle alte temperature e ad ampie variazioni di pH, mantenendosi quindi stabile per lungo tempo nelle condizioni ambientali di allevamento⁴⁰. L'assenza dell'*envelope* lo rende resistente ai solventi dei lipidi, ma viene inattivato da disinfettanti alcalini (idrossido di sodio), agenti ossidanti (ipoclorito di sodio) e dai sali quaternari d'ammonio⁴².

Le pratiche di gestione possono influenzare le dinamiche d'infezione, come dimostrato anche da un approccio modelistico⁴³. In particolare, maggiori dimensioni dei box nella *nursery* e l'intensità della pratica del *cross-fostering* possono modificare l'epidemiologia dell'infezione favorendo infezioni precoci, che più probabilmente provocano manifestazioni cliniche sistemiche di PCVD. Rilevante anche la dimostrazione di una associazione tra aumento della percentuale di dosi di sperma infetto e aumento del rischio di infezioni precoci⁴³. Quest'ultima osservazione è compatibile con la messa in evidenza che l'utilizzo di sperma di origine aziendale aumenta il rischio di infezione. Sebbene la presenza di PCV2 nello sperma non costituisca una prova definitiva della possibilità di trasmissione venerea, i centri per la produzione di materiale seminale dovrebbero essere indenni dai principali patogeni, tra cui PCV2⁴⁴.

PROFILO IMMUNITARIO DOPO L'IMPLEMENTAZIONE DELLA PROFILASSI VACCINALE

Prima dell'introduzione della profilassi vaccinale, il controllo delle PCVD si limitava principalmente al miglioramento delle strategie di gestione dell'allevamento e al controllo delle coinfezioni. La vaccinazione è ora invece uno strumento importante per il controllo dell'infezione da PCV2⁴⁵.

La disponibilità commerciale di vaccini anti-PCV2 risale al 2004 in Europa e al 2006 in Nord America e tali prodotti sono oggi disponibili in tutto il mondo⁴⁶. La diminuzione dell'incidenza ed il miglioramento dell'efficienza produttiva dopo l'adozione della vaccinazione, hanno chiaramente fatto emergere le conseguenze negative che l'infezione da PCV2 ha sulla salute e sulla produttività dei suini⁴⁷. Infatti, oltre a ridurre la mortalità associata alle forme sistemiche di PCVD, l'introduzione della vaccinazione ha determinato un incremento della produttività anche nelle aziende non colpite da PMWS o, in quelle colpite, ha condizionato l'aumento delle produzioni oltre i livelli presenti prima che segni clinici di PMWS apparissero in allevamento. Questi miglioramenti economici e sanitari hanno reso evidente l'esistenza di forme subcliniche d'infezione (PCV2-SI), condizioni in cui i suinetti clinicamente sani, presentano una riduzione degli IPMG e sono maggiormente recettivi ad altri patogeni. Queste forme condizionano negativamente l'economia aziendale, contribuendo inoltre all'aumento della mortalità nel periodo post-svezzamento⁴⁸.

La profilassi vaccinale si basa sull'impiego di prodotti diversi nella loro formulazione: il primo vaccino immesso in commercio è stato allestito da un ceppo di PCV2a inattivato ed è registrato per l'uso su suinetti di età superiore alle tre settimane di vita e sulle scrofe. In seguito, sono stati commercializzati vaccini ricombinanti a subunità basati sulla proteina del capsode virale di PCV2a espressa in un sistema di baculovirus⁴⁹. Un ulteriore vaccino, registrato per l'immunizzazione di suinetti oltre le tre settimane di vita, è allestito con un virus PCV1/PCV2 chimerico inattivato^{48,49}.

La valutazione dell'efficacia dei vaccini anti-PCV2 è basata sugli stessi criteri utilizzati per la diagnosi di PMWS: presenza dei segni clinici di malattia, presenza di lesioni microscopiche caratteristiche e presenza di PCV2 nelle lesioni a cui si aggiunge la determinazione della carica virale nel siero in associazione ai segni clinici⁴⁵ (Figura 6).

I vaccini commerciali si sono dimostrati molto efficaci nel ridurre i segni clinici di malattia e nel migliorare l'IPMG dei suinetti, con conseguente miglioramento degli indici economici aziendali^{28,45}. Sono inoltre in grado di abbassare la percentuale di suini viremici, il livello di viremia, la carica virale in tamponi nasali e fecali⁴, riducendo l'escrezione virale e, di conseguenza, il rischio di trasmissione anche in condizioni di campo^{45,50}.

Dal momento che la carica virale sierica ridotta e la diminuita presenza di PCV2 negli organi target, determinate con tecniche di biologia molecolare, sono fortemente correlate a bassi punteggi istopatologici nei tessuti linfoidi, ne deriva che l'impiego di vaccini in grado di ridurre la quantità di PCV2 nel siero e nei linfonodi determina di conseguenza anche una riduzione della gravità delle lesioni istologiche⁷.

I risultati di uno studio condotto in USA riportano che a 6 anni dall'introduzione della vaccinazione, avvenuta a partire dal 2006, è stata ottenuta una riduzione della prevalenza di animali viremici e dei livelli di viremia, un aumento degli allevamenti negativi a PCV2 e la diminuzione della prevalenza di suini sieropositivi a seguito di infezione naturale⁵¹.

La protezione dei suinetti può essere ottenuta mediante un'immunizzazione attiva o passiva (vaccinando le scrofe) o dalla combinazione delle due strategie⁴⁵. Sperimentalmente è stato dimostrato che i suinetti con elevati livelli di anticorpi passivi presentano una riduzione della carica virale sierica inversamente correlata al titolo anticorpale⁵². L'immunità passiva di origine materna gioca un ruolo importante nella prevenzione della PMWS. Tuttavia, il rilevamento del genoma o dell'antigene virale nei tessuti anche dopo il trasferimento dell'immunità passiva indica che gli anticorpi di derivazione materna non sono sempre in grado di prevenire l'in-

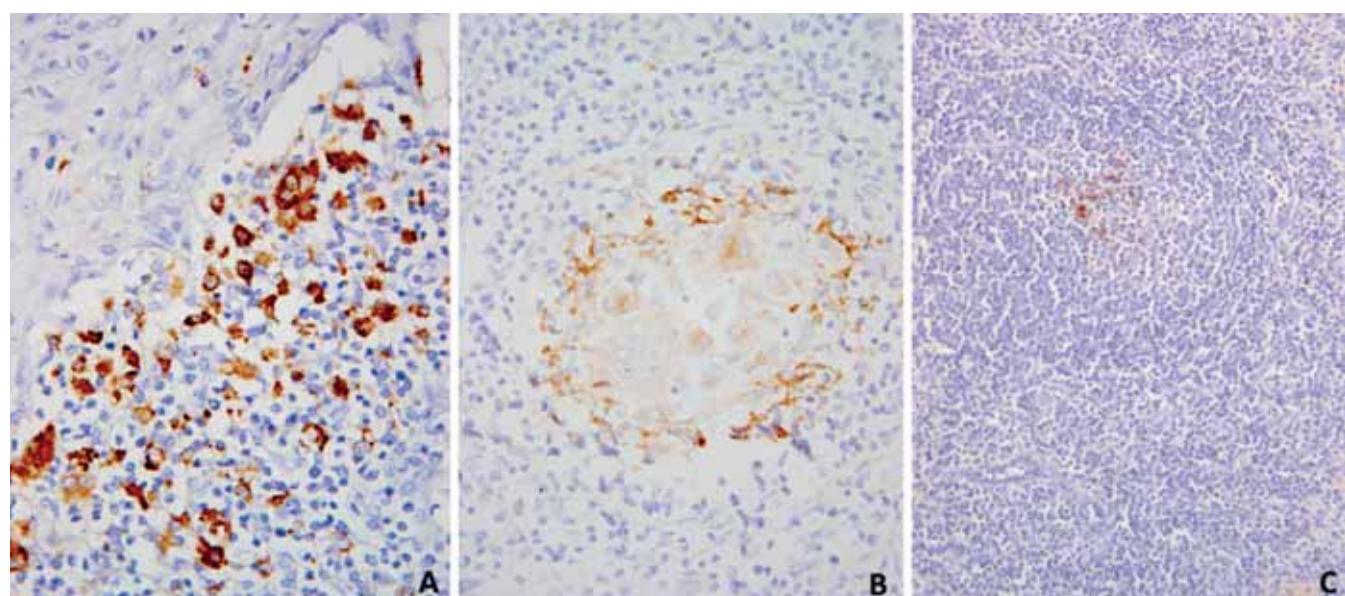


Figura 6 - In (A) abbondante antigene virale in cellule istiocitarie in corso di deplezione linfoidi in un caso di PMWS. (B) antigene virale presente sia in cellule istiocitarie che in macrofagi epiteliodi in un granuloma linfonodale. (C) linfonodo normostrutturato con bassa carica virale al centro di un follicolo; il metodo rappresenta la stima indiretta della carica virale residua in risposta all'efficacia della vaccinazione. Reazione immunoistochimica per PCV2 con anticorpo monoclonale F217. (A) 40x; (B) 40x; (C) 20x.

fezione. La persistenza di PCV2 nei tessuti è anch'essa correlata al titolo degli anticorpi di derivazione materna ancora presenti al momento dell'infezione⁵². La vaccinazione delle scrofe esposte naturalmente al virus riduce anche la quantità di PCV2 trasmessa ai suinetti attraverso il colostro, pur non eliminando la diffusione virale attraverso questa via⁹. Sebbene PCV2 sia trasmesso dalle scrofe ai suinetti tramite il colostro, i suinetti nati da madri vaccinate si presentano non virremici allo svezzamento; pertanto gli anticorpi neutralizzanti di derivazione materna sembrano essere in grado di controllare l'infezione nelle fasi iniziali della vita dell'animale⁵³. In condizioni di campo, la vaccinazione delle scrofe è in grado di migliorare anche i parametri produttivi dei suinetti. In un allevamento con numerosi casi di PMWS acuta, la vaccinazione delle sole scrofe ha consentito il raggiungimento del peso di macellazione in periodi di tempo più brevi e ha ridotto la mortalità pre-svezzamento, portandola a percentuali inferiori rispetto a quelle registrate prima del focolaio⁵⁴. La vaccinazione delle scrofe è efficace anche nelle condizioni di infezione subclinica, determinando un aumento dell'IPMG con conseguente riduzione della durata della fase d'ingrasso⁸.

L'applicazione di protocolli vaccinali anti-PCV2 a lungo termine sulle scrofe, in allevamenti con problemi riproduttivi, influenza positivamente anche altri parametri quali: tasso di inseminazione, numero di suinetti nati vivi e svezzati per parto e peso corporeo alla nascita⁵⁵. Inoltre, la vaccinazione delle scrofe ha un ruolo protettivo nei confronti dei problemi riproduttivi associati a PCV2⁵⁶.

La vaccinazione di entrambe le categorie produttive (scrofe e suinetti a 21 giorni d'età), determina una riduzione dei livelli di viremia e della quantità di antigene virale a livello di tessuti linfoidi maggiore rispetto che la sola vaccinazione delle scrofe⁵⁷.

Studi sperimentali e di campo hanno suggerito che la presenza di elevate quantità di anticorpi di derivazione materna possa influenzare l'efficacia della vaccinazione, sia in termini di risposta immunitaria umorale indotta da vaccino sia in termini di IPMG⁵⁸. Relativamente alla risposta immunitaria umorale, è stato dimostrato che alti titoli anticorpali al momento della vaccinazione condizionano negativamente la sieroconversione post-vaccinale, nonché lo sviluppo di una efficace risposta cellulo-mediata, influenzando negativamente lo sviluppo dell'immunità attiva nei confronti del virus. Alcuni autori ritengono che la vaccinazione di suinetti con immunità passiva a 49 giorni di vita (piuttosto che a 21) potrebbe essere più efficace per il controllo dell'infezione, in particolare se questa si verifica durante il periodo dell'accrescimento⁵⁹. Posticipare l'intervento vaccinale ha conseguenze trascurabili sull'IPMG⁵⁸.

Il declino degli anticorpi passivi rende gli animali recettivi all'infezione, con conseguente sieroconversione attiva²². Lo scopo dello stimolare l'immunità dei suinetti mediante la vaccinazione è quella di fornire protezione contro l'infezione da PCV2, riducendo incidenza e gravità delle forme cliniche e subcliniche di PCVD²⁵.

La valutazione morfologica dell'estensione della presenza dell'antigene virale, eseguita mediante tecniche di immunostochimica (IHC) ed ibridazione *in situ* (ISH), e della deplezione linfoidi nei linfonodi, sono criteri critici nella valutazione dell'efficacia dei vaccini anti-PCV2 in quanto queste caratteristiche sono fondamentali per la diagnosi di PCVD (Figura 6). In studi di valutazione dell'efficacia dei vaccini da

utilizzare sui suinetti⁶⁰, entrambi questi parametri (deplezione linfoidi e deposizione dell'antigene a livello di tessuti linfoidi) sono risultati ridotti dopo l'impiego della vaccinazione e successivo challenge con PCV2b³⁴.

Alla luce del ruolo svolto da PCV2 nelle coinfezioni, si ritiene che la vaccinazione anti-PCV2 possa indirettamente conferire protezione anche nei confronti di altri agenti patogeni, come nel caso della prevenzione del complesso delle malattie respiratorie del suino⁶¹. Numerosi studi hanno dimostrato la relazione tra PCV2 e PRRSV, e come la presenza di PRRSV possa aggravare le lesioni associate a PCV2 e aumentare il livello di presenza dell'antigene PCV2 nei tessuti⁶², in particolare nella coinfezione con PRRSV tipo 2⁶³.

È stato dimostrato che, in presenza di circolazione di PRRSV, la vaccinazione anti-PCV2 riduce significativamente la gravità delle lesioni polmonari e linfoidi associate a PCV2 e la probabilità di rilevare gli antigeni di PCV2 nei tessuti^{62,64}. Sempre in presenza di circolazione di PRRSV, la mancata vaccinazione anti-PCV2 riduce l'efficacia della vaccinazione nei confronti di PRRSV⁶⁴.

Ne consegue che nelle aziende in cui è presente coinfezione PCV2-PRRSV, la vaccinazione contro PCV2 è prioritaria, in quanto l'infezione da PCV2 riduce l'efficacia del vaccino anti-PRRSV⁶¹. Al contrario, la vaccinazione per PRRSV è giustificata dalla necessità di ridurre l'impatto negativo dell'infezione sullo stato di salute degli animali in termini di insorgenza di PCVD⁶⁵. Una sperimentazione condotta in aziende con presenza di casi di PMWS definiti sulla base di criteri patologici accettati a livello internazionale (presenza di segni clinici, lesioni macroscopiche, reperti istopatologici e presenza di PCV2 nelle lesioni linfoidi), ha dimostrato il coinvolgimento di PRRSV nel determinismo del focolaio di PMWS. Lo studio condotto in campo ha inoltre valutato gli effetti delle vaccinazioni contro PRRSV e PCV2, in associazione o somministrati singolarmente, in termini di segni clinici, mortalità e IPMG rispetto a gruppi di suini non vaccinati. Lo studio ha dimostrato che la vaccinazione in associazione induce protezione nei confronti dello sviluppo di forme cliniche e, nonostante non riduca la viremia da PRRSV, riduce incidenza, mortalità, durata della viremia e carica virale di PCV2 e migliora le prestazioni produttive⁶⁵.

Nelle aziende in cui prevale la coinfezione PCV2-*Mycoplasma hyopneumoniae*, è invece necessaria la vaccinazione nei confronti di entrambi i patogeni: in condizioni sperimentali⁶⁶, è stato dimostrato che la sola vaccinazione nei confronti di PCV2 è efficace nel ridurre la viremia e le lesioni polmonari e linfoidi associate a PCV2, ma non è in grado di ridurre la gravità delle lesioni polmonari indotte da *M. hyopneumoniae* nei suini infetti da entrambi i patogeni, a causa dell'interazione indipendente tra i due vaccini e i due agenti eziologici⁶¹.

INFLUENZA DELLA VACCINAZIONE SUL GENOTIPO DI PCV2 PREVALENTE

Nonostante in USA la copertura vaccinale sia quasi del 100%, il DNA di PCV2 può ancora essere rilevato nel 25% dei tessuti di suino esaminati, con una netta predominanza del genotipo PCV2d che, probabilmente, ha tratto vantaggio dalla pressione immunitaria vaccinale⁶⁷.

Studi di genomica virale hanno evidenziato che tra i trascritti RNA specifici per PCV2, quattro sono tradotti in proteine con ruoli biologici rilevanti: ORF1, ORF2, ORF3 e ORF4. ORF1 codifica per le proteine Rep e Rep', necessarie per la replicazione del genoma virale; ORF2 codifica per la proteina Cap, principale proteina del capsid ed elemento immuno-geno virale; ORF3 e ORF4, localizzate nella stessa regione di ORF1 ma nel filamento antisenso, codificano per due proteine non strutturali coinvolte nella regolazione della replicazione virale e nell'apoptosi della cellula ospite⁶⁸. Il genotipo PCV2d in particolare, differisce dagli altri genotipi per la presenza di un residuo di lisina extra all'estremità carbossi-terminale di Cap⁶⁹.

La pressione immunitaria selettiva, sviluppata a seguito di infezione naturale o vaccinazione, ha un ruolo chiave nell'influenzare la possibilità che emergano nuove varianti e si diffondano nuovi genotipi di PCV2⁷⁰. A causa del suo alto tasso di evoluzione, PCV2 può adattarsi rapidamente a pressioni selettive indotte dalla vaccinazione stessa. È già stato dimostrato che le popolazioni di PCV2 presenti nelle aziende in cui si pratica la vaccinazione differiscono nella composizione genomica del virus circolante, rispetto a quelle in cui non viene applicato un protocollo vaccinale. Nelle aziende che vaccinano da almeno due anni, si rileva la presenza di mutazioni a bassa frequenza che, sebbene non favorevoli per il *fitness* virale nel dato momento, possono andare a costituire mutanti con potenziale ruolo di *reservoir* che permettono un rapido adattamento del virus in caso di variazioni di condizioni ambientali, di cofattori, di dinamiche della popolazione ospite. Possono quindi verificarsi mutazioni inaspettate e vantaggiose per il virus che determinano l'aumento delle loro frequenze nella popolazione virale⁷¹. Allo stesso modo, alla luce dell'evidenza che nei genotipi PCV2a e PCV2b la variazione di un singolo aminoacido è stata in grado di abolire l'attività neutralizzante di un anticorpo monoclonale contro il genotipo 2b⁷², piccole variazioni cumulative nella proteina del capsid possono portare alla fuga immunitaria indotta da vaccino. L'attuale prevalenza di PCV2d potrebbe quindi riflettere la mancanza di una protezione immunologica completa da parte dei vaccini attuali contro questo genotipo⁴⁶.

I principali vaccini commerciali disponibili sono allestiti a partire dal genotipo PCV2a o dalla sua proteina del capsid e sono efficaci nell'indurre immunità umorale e cellulo-media-ta contro PCV2a^{46,73,74}, ma sono anche in grado di controllare l'infezione da PCV2b⁴. Tuttavia, per quanto i vaccini anti-PCV2a generalmente prevengano la malattia clinica e riducano la prevalenza del genotipo 2a, potrebbero non ridurre la prevalenza di PCV2b. È stato infatti dimostrato che la vaccinazione omologa nei confronti del genotipo 2b riduce maggiormente la viremia rispetto al vaccino eterologo, anche in presenza di coinfezione PCV2a e PCV2b⁶⁹. D'altro canto, studi di campo hanno rivelato, sulla base di dati clinici, virologici ed immunologici, l'efficacia dei vaccini-PCV2a nel conferire adeguata protezione nei confronti di coinfezioni PCV2b e PCV2d⁷⁵. Sembra quindi che i vaccini attualmente disponibili siano adeguati nella prevenzione delle forme cliniche, ma potrebbero rappresentare una situazione definita come *leaky vaccines*. Infatti, al contrario di quelli *all-or-none* che riducono i tassi d'infezione a zero per una parte di soggetti, indipendentemente dal numero di esposizioni, i *leaky vaccines* tendono a ridurre la velocità di trasmissione e il tasso di infec-

zione ma sulla base della variabile del tasso di esposizione: non conferiscono protezione adeguata in condizioni di esposizione ripetuta e con influenza di altri cofattori⁴⁶.

Nel genotipo PCV2d è stato riscontrato un aumento della diversità genetica nel tempo, tanto che gli isolati identificati di recente vengono oggi denominati PCV2d2⁷⁶. Per far fronte alla preoccupazione riguardo la possibilità di selezione di ceppi PCV2 sempre più geneticamente e antigenicamente divergenti, le strategie vaccinali vanno concentrandosi sull'ampliamento dello spettro di protezione del singolo vaccino, affinché sia garantita protezione anche nei confronti di genotipi emergenti come PCV2d, e nei confronti del predominante PCV2b. A questo scopo, alcuni autori⁷⁷ hanno mirato alla riproduzione molecolare del DNA virale mescolando i geni codificanti per le proteine del capsid di 5 sottotipi di PCV2 geneticamente diversi, al fine di creare un virus chimerico che potrebbe indurre un'ampia protezione crociata contro i diversi genotipi. In uno studio condotto *in vivo*, il virus chimerico PCV2-3cl14 ha dimostrato il più alto livello di cross neutralizzazione contro i diversi sottotipi; successivamente in uno studio di efficacia contro i ceppi PCV2b e PCV2d, è stato dimostrato che il vaccino costituito con il virus chimerico 3cl14 determina una riduzione significativa della quantità di DNA virale al picco della viremia, nonché una riduzione della presenza del virus nei tessuti linfoidi; inoltre le lesioni linfoidi sono risultate ridotte nei gruppi vaccinati successivamente esposti a PCV2b. La vaccinazione con virus chimerico ha quindi indotto un'immunità protettiva nei confronti di PCV2b e PCV2d⁷⁷.

VACCINI ANTI-PCV2 E TIPOLOGIA DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

La comparsa di segni clinici è efficacemente controllata dalla vaccinazione ma, in condizioni di campo, permane il problema rappresentato dall'insorgenza di infezioni subcliniche che possono potenzialmente causare effetti negativi quali la riduzione della risposta immunitaria sistemica, con ripercussioni sulla resistenza allo sviluppo di malattie. In uno studio condotto per determinare se la sola vaccinazione potesse essere sufficiente per eradicare PCV2 da un allevamento⁷⁸, la vaccinazione ripetuta ha ridotto la presenza del virus ma non è stata in grado di eliminarla, e PCV2 è riemerso poco dopo la sospensione della vaccinazione. I vaccini sono quindi eccellenti per la profilassi ma quelli attualmente disponibili non sono proteggenti nei confronti dell'infezione²⁸.

La maggior parte dei suini presenta anticorpi specifici contro PCV2⁷⁹ e, in aziende in cui sono stati diagnosticati casi di PMWS, la sieroprevalenza è elevata, con concomitante viremia ed escrezione virale³⁹. Tuttavia, i suini con PMWS presentano titoli inferiori di anticorpi neutralizzanti rispetto agli animali con infezione subclinica²⁷. Sebbene importanti da un punto di vista immunitario, gli anticorpi neutralizzanti sono efficaci esclusivamente nei confronti del virus extracellularare e dell'antigene di superficie cellulare. Considerando tuttavia che PCV2 è un virus privo di *envelope* è improbabile che la sua proteina capsidica sia espressa sulla superficie delle cellule infette: le proteine virioniche potrebbero quindi non rappresentare un bersaglio per la difesa immunitaria mediata da anticorpi ma sarebbero necessari altri meccanismi citotossici⁸⁰.

È stato dimostrato che la *clearance* virale coincide con la comparsa di cellule secernenti IFN- γ (SC) specifiche per PCV2, prima della comparsa degli anticorpi neutralizzanti specifici³⁴. Negli animali che resistono allo sviluppo della malattia si sviluppano risposte immunitarie medicate da cellule T CD4+ e CD8+⁸⁰, dirette contro le proteine del capsid Cap con produzione di IFN- γ -SC, e contro la proteina replicasi Rep codificata dal gene ORF1⁸¹. Cap risulta essere un buon immunogeno per le cellule T, determinando una risposta IFN- γ -SC maggiore; lo sviluppo di significative risposte IFN- γ contro Rep sembra invece essere correlato al livello di replicazione del virus, essendo rilevato più frequentemente in suini con presenza di lesioni associate a PCV2 e con presenza di virus nel siero e nei tessuti⁸¹. L'induzione della risposta cellulo-mediata contro Cap potrebbe dunque essere di fondamentale importanza per evitare la persistenza virale nelle cellule del lignaggio monocitico-macrofagico; viceversa, poiché Rep è altamente espressa nelle cellule che supportano la replicazione di PCV2, le risposte cellulari dirette a Rep potrebbero essere importanti per limitare la replicazione del virus e prevenire la progressione dell'infezione verso la PMWS⁸¹.

In uno studio di infezione-vaccinazione controllato, l'analisi delle risposte delle cellule T antigene-specifiche contro PCV2, ha permesso di evidenziare che l'induzione di cellule T CD4+ coproducenti IFN- γ /TNF- α da parte di un agente non replicativo, come l'antigene vaccinale, è associata ad un passaggio isotipico da IgM a IgG, ed esplica una funzione di supporto per la produzione di anticorpi. Contrariamente agli anticorpi specifici contro PCV2, queste cellule sono state indotte in tutti i suini vaccinati, che sono risultati protetti dalla viremia; ciò a supporto dell'ipotesi che queste cellule T produttrici di citochine svolgono un ruolo importante nella protezione nei confronti di PCV2⁸². È emerso inoltre che le cellule T di memoria specifica dell'antigene persistono a lungo termine dopo l'infezione/vaccinazione, e sono in grado di espandersi rapidamente dopo il richiamo e riconoscimento dell'antigene, riuscendo così a contrastare rapidamente l'infezione da PCV2⁸³.

Nonostante il successo della vaccinazione, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da PCV2²⁸. Attualmente, i vaccini anti-PCV2 sono ampiamente utilizzati ma, poiché non inducono un'immunità protettiva nei confronti dell'infezione, il virus continua a circolare anche nelle aziende suinicole che applicano la vaccinazione⁸⁴.

È stato dimostrato che vi sono differenze quantitative nell'induzione dell'immunità cellulo-mediata e umorale tra le diverse tipologie di vaccini commerciali registrati per l'uso sui suinetti: il vaccino allestito con virus chimerico PCV1/PCV2 determina la produzione di proporzioni relative più elevate di cellule CD4+ e livelli più elevati di risposta IFN- γ -SC e NA rispetto ai due vaccini a subunità, e si ritiene che la differenza nelle risposte immunitarie possa essere dovuta a differenze nella composizione degli antigeni o al tipo di adiuvanti usati nella formulazione dei prodotti. Lo stesso antigene Cap in formulazione con diversi adiuvanti determina risposte simili nei suinetti vaccinati con i due vaccini a subunità, e questo suggerisce che il tipo antigenico, piuttosto che il tipo di adiuvante, può essere l'elemento critico nella risposta immunitaria⁶⁰.

La proteina del capsid è il determinante antigenico principale del virus, verso cui sono dirette le risposte del sistema

immunitario; risulta essere quindi sottoposta ad elevata pressione selettiva, come osservato dal più alto tasso di mutazione nel gene che la codifica^{46,76}. La risposta del sistema immunitario nei confronti di PCV2 è generata dall'equilibrio tra risposte umorali e cellulo-mediata^{73,74} ed è stato dimostrato⁸¹ come nello sviluppo di una risposta cellulo-mediata nei confronti di PCV2 siano coinvolte la proteina Cap e la proteina Rep codificate dai geni ORF1 e ORF2 del virus: da ciò l'importanza di comprendere la caratterizzazione delle regioni antigeniche e immunogeniche della proteina Cap-PCV2, che può contribuire al miglioramento delle formulazioni vaccinali⁸⁵.

Gli epitopi immunodominanti della proteina del capsid di PCV2, costituita di 233 residui, inizialmente sono stati individuati come localizzati nei residui aminoacidici 65-87, 113-139, 168-183 e presso gli ultimi 4 aminoacidi dell'estremità carbossi-terminale della proteina⁸⁶. Nel corso degli anni si sono susseguiti numerosi studi per la caratterizzazione delle regioni epitopiche del Cap-PCV2. Nello studio di Santos *et al.*⁸⁵, l'evidenza di risposta immunitaria Th1 e Th2 nel modello topo in seguito a stimolazione con i nuovi siti antigenici rilevati, seguita dalla convalida mediante test ELISA su siero di suino, mostra come il sito antigenico rilevato possa essere importante durante l'infezione da PCV2, e potrebbe essere utile come obiettivo per la progettazione futura di nuovi antigeni ricombinanti, al fine di migliorare l'efficacia delle risposte vaccinali.

Per migliorare l'efficacia dei vaccini, altre ricerche si stanno concentrando sullo studio di coniugazione degli antigeni con adiuvanti diversi da quelli presenti nei vaccini commerciali; è il caso dello studio di una formulazione vaccinale mediante coniugazione covalente di vaccino inattivato-PCV2 con oligosaccaridi di chitosano (COS), che hanno mostrato versatili funzioni biologiche tra cui quella immunostimolante⁸⁷.

Allo stesso modo, alcuni autori⁸⁸, propongono l'utilizzo di citochine (IL-2 e IL-4/6), molecole regolatorie chiave delle funzioni immunitarie in termini di coordinazione delle risposte cellulari Th1 e Th2, come coadiuvanti nel determinare una risposta immunitaria protettiva e completa. I risultati dello studio confermano l'importante ruolo protettivo della risposta cellulo-mediata, dal momento che il vaccino sperimentale PCV2+IL4/6-2 non ha migliorato tanto la risposta immunitaria umorale quanto quella cellulare: i livelli di anticorpi specifici per PCV2 indotti dal vaccino PCV2+IL4/6-2 risultano simili a quelli ottenuti con vaccini tradizionali; al contrario, il miglioramento delle risposte immunitarie in seguito alla vaccinazione sperimentale è caratterizzato da un significativo aumento della risposta Th1, con incremento dell'espressione di cellule CD4+, CD8+, IL-2 e TNF- α e aumento dell'espressione di geni correlati, come quelli dei TLR, ad evidenziare un rafforzamento concomitante dell'immunità innata, oltre che di quella adattativa⁸⁸.

CONCLUSIONI

Con l'avvento della vaccinazione, sia l'incidenza sia la gravità delle *porcine circovirus diseases* (PCVD) si è fortemente ridotta. Tuttavia, i vaccini attualmente disponibili non sono in grado di prevenire le infezioni subcliniche che rappresentano attualmente il problema principale sia in termini di ridu-

zione della produttività degli animali sia in termini di interazione sinergica con altri patogeni aziendali.

Lo studio e la comprensione dell'interazione tra PCV2 e sistema immunitario e dei meccanismi alla base dello sviluppo di una risposta immunitaria protettiva, sono i necessari presupposti per la sperimentazione di nuove formulazioni vaccinali. L'obiettivo per il prossimo futuro sarà quello di rendere disponibili dei vaccini che siano in grado di ridurre non solo l'espressione clinica delle PCVD ma che possano garantire anche una significativa riduzione della prevalenza di infezioni subcliniche, aprendo così la strada alla concreta possibilità di eradicazione di PCV2 dalle aziende suinicole.

■ Interaction between PCV2 and immune system. What changed after the introduction of vaccination

SUMMARY

Porcine circovirus diseases (PCVD) are important causes of economic losses in intensive pig farming. Porcine circovirus type 2 (PCV2) causes systemic (post-weaning multisystemic wasting syndrome - PMWS) and localized (respiratory, enteric, dermatitis-nephritis and reproductive) diseases and is also responsible for subclinical forms of infection causing reduction of average daily gain, growth retardation and increased susceptibility to other infections. For these reasons, PCV2 infection control is an international priority. In recent years, the availability of safe and effective vaccines has made it possible to reduce the incidence and severity of clinical forms, in particular PMWS, to increase the productivity of growing animals and to improve the reproduction parameters of sows. However, despite the successes of vaccination, most of the pig population is still PCV2 chronically infected, even in farms that use indirect prophylaxis plans. In addition, available vaccines are not able to prevent subclinical infections that are currently the main health problem. In sub-clinical infections, function loss of the natural interferon-producing cells (NIPC) and downregulation of TNF- α and IFN- α take place. These changes allow an altered balance of pro-inflammatory, pro-immune and regulatory cytokines that result in the upregulation of IL-10 and down-regulation IFN- γ . The effect is the inefficiency in triggering of an adequate innate pro-inflammatory response, impairment of the recognition of viral and bacterial associated signals, and consequently impairment of the T and B cell responses. Due to these interactions between PCV2 and the immune system, an impairment of both innate and adaptive responses allow the occurrence of subclinical infections that are responsible for severe economic consequences. This impairment of innate and adaptive defenses also explains the role played by PCV2 in coinfections. The anti-PCV2 vaccination can therefore, indirectly, improve the health status also against other pathogens reducing, for example, the incidence of the of porcine respiratory diseases complex (PRDC). Furthermore, in farms where PCV2 and PRRSV are circulating simultaneously, vaccination against PCV2 increases the effectiveness of the anti-PRRSV vaccine. The understanding of the interaction between PCV2 and the immune system and the mechanisms underlying the development of a protective immune

response are the necessary prerequisites for the testing of new vaccine formulations. The goal for the near future will be to make available vaccines that can not only decrease the clinical expression of PCVD, but also guarantee a significant reduction in the prevalence of subclinical infections, thus paving the way for the concrete possibility of eradication of PCV2 from pig farms.

KEY WORDS

Swine; PCV2; PCVD; immune system; vaccination.

Bibliografia

- Segales J., Kekarainen T., Cortey M. (2013). The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet Microbiol*, 165: 13-20.
- Patterson A.R., Opiressnig T. (2010). Epidemiology and horizontal transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim Health Res Rev*, 11: 217-34.
- Albina E., Truong C., Hutet E., Blanchard P., Cariolet R., L'Hospitalier R., Mahe D., Allee C., Morvan H., Amenna N., Le Dimna M., Madec F., Jestin A. (2001). An experimental model for post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in growing piglets. *J Comp Pathol*, 125: 292-303.
- Fort M., Sibila M., Allepuz A., Mateu E., Roerink F., Segales J. (2008). Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins. *Vaccine*, 26: 1063-71.
- Cline G., Wilt V., Diaz E., Edler R. (2008). Efficacy of immunising pigs against porcine circovirus type 2 at three or six weeks of age. *Vet Rec*, 163: 737-40.
- Fachinger V., Bischoff R., Jedidia S.B., Saalmuller A., Elbers K. (2008). The effect of vaccination against porcine circovirus type 2 in pigs suffering from porcine respiratory disease complex. *Vaccine*, 26: 1488-99.
- Segales J., Urniza A., Alegre A., Bru T., Crisci E., Nofrarias M., Lopez-Soria S., Balasch M., Sibila M., Xu Z., Chu H.J., Fraile L., Plana-Duran J. (2009). A genetically engineered chimeric vaccine against porcine circovirus type 2 (PCV2) improves clinical, pathological and virological outcomes in postweaning multisystemic wasting syndrome affected farms. *Vaccine*, 27: 7313-21.
- Kurmann J., Sydler T., Brugnera E., Buerki E., Haessig M., Suter M., Sidler X. (2011). Vaccination of dams increases antibody titer and improves growth parameters in finisher pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2. *Clin Vaccine Immunol*, 18: 1644-9.
- Gerber P.F., Garrocho F.M., Lana A.M., Lobato Z.I. (2011). Serum antibodies and shedding of infectious porcine circovirus 2 into colostrum and milk of vaccinated and unvaccinated naturally infected sows. *Vet J*, 188: 240-2.
- Meng X.J. (2013). Porcine circovirus type 2 (PCV2): pathogenesis and interaction with the immune system. *Annu Rev Anim Biosci*, 1: 43-64.
- Chianini F., Majo N., Segales J., Dominguez J., Domingo M. (2003). Immunohistochemical characterisation of PCV2 associate lesions in lymphoid and non-lymphoid tissues of pigs with natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*, 94: 63-75.
- Sarli G., Mandrioli L., Laurenti M., Sidoli L., Cerati C., Rolla G., Marcato P.S. (2001). Immunohistochemical characterisation of the lymph node reaction in pig post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*, 83: 53-67.
- Marruchella G., Valbonetti L., Bernabo N., Ligios C. (2017). Depletion of follicular dendritic cells in tonsils collected from PMWS-affected pigs. *Arch Virol*, 162: 1281-1287.
- Darwich L., Segales J., Domingo M., Mateu E. (2002). Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine circovirus type 2 load in lymphoid tissues. *Clin Diagn Lab Immunol*, 9: 236-42.
- Mandrioli L., Sarli G., Panarese S., Baldoni S., Marcato P.S. (2004). Apoptosis and proliferative activity in lymph node reaction in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Immunol Immunopathol*, 97: 25-37.
- Gilpin D.F., McCullough K., Meehan B.M., McNeilly F., McNair I., Stevenson L.S., Foster J.C., Ellis J.A., Krakowka S., Adair B.M., Allan G.M.

- (2003). In vitro studies on the infection and replication of porcine circovirus type 2 in cells of the porcine immune system. *Vet Immunol Immunopathol*, 94: 149-61.
17. Steiner E., Balmelli C., Herrmann B., Summerfield A., McCullough K. (2008). Porcine circovirus type 2 displays pluripotency in cell targeting. *Virology*, 378: 311-22.
 18. Vincent I.E., Balmelli C., Meehan B., Allan G., Summerfield A., McCullough K.C. (2007). Silencing of natural interferon producing cell activation by porcine circovirus type 2 DNA. *Immunology*, 120: 47-56.
 19. Vincent I.E., Carrasco C.P., Guzylack-Piriou L., Herrmann B., McNeilly F., Allan G.M., Summerfield A., McCullough K.C. (2005). Subset-dependent modulation of dendritic cell activity by circovirus type 2. *Immunology*, 115: 388-98.
 20. Balmelli C., Steiner E., Moulin H., Peduto N., Herrmann B., Summerfield A., McCullough K. (2011). Porcine circovirus type 2 DNA influences cytoskeleton rearrangements in plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, 132: 57-65.
 21. Darwich L., Mateu E. (2012). Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 164: 61-7.
 22. Grau-Roma L., Hjulsager C.K., Sibila M., Kristensen C.S., Lopez-Soria S., Enoe C., Casal J., Botner A., Nofrarias M., Bille-Hansen V., Fraile L., Baekbo P., Segales J., Larsen L.E. (2009). Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark. *Vet Microbiol*, 135: 272-82.
 23. Okuda Y., Ono M., Yazawa S., Shibata I. (2003). Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in cesarean-derived, colostrum-deprived piglets inoculated with porcine circovirus type 2 (PCV2): investigation of quantitative PCV2 distribution and antibody responses. *J Vet Diagn Invest*, 15: 107-14.
 24. McIntosh K.A., Harding J.C., Ellis J.A., Applebyard G.D. (2006). Detection of Porcine circovirus type 2 viremia and seroconversion in naturally infected pigs in a farrow-to-finish barn. *Can J Vet Res*, 70: 58-61.
 25. Segales J. (2015). Best practice and future challenges for vaccination against porcine circovirus type 2. *Expert Rev Vaccines*, 14: 473-87.
 26. Fort M., Olvera A., Sibila M., Segales J., Mateu E. (2007). Detection of neutralizing antibodies in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs. *Vet Microbiol*, 125: 244-55.
 27. Meerts P., Misinzo G., Lefebvre D., Nielsen J., Botner A., Kristensen C.S., Nauwynck H.J. (2006). Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. *BMC Vet Res*, 2: 6.
 28. Afghah Z., Webb B., Meng X.J., Ramamoorthy S. (2017). Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: Is eradication a possibility? *Vet Microbiol*, 206: 21-28.
 29. Borgeltti P., Morganti M., Saleri R., Ferrari L., De Angelis E., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Martelli P. (2013). Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden. *Vet Microbiol*, 163: 42-53.
 30. Kekarainen T., Montoya M., Mateu E., Segales J. (2008). Porcine circovirus type 2-induced interleukin-10 modulates recall antigen responses. *J Gen Virol*, 89: 760-5.
 31. Darwich L., Segales J., Resendes A., Balasch M., Plana-Duran J., Mateu E. (2008). Transient correlation between viremia levels and IL-10 expression in pigs subclinically infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Res Vet Sci*, 84: 194-8.
 32. Yue F., Cheng A., Zhu Y., Li P., Zhang Y., Sun G., Wang M., Wang X. (2015). Overexpression of programmed death ligands in naturally occurring postweaning multisystemic wasting syndrome. *Viral Immunol*, 28: 101-6.
 33. Richmond O., Cecere T.E., Erdogan E., Meng X.J., Pineyro P., Subramaniam S., Todd S.M., LeRoith T. (2015). PD-L1 expression is increased in monocyte derived dendritic cells in response to porcine circovirus type 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections. *Vet Immunol Immunopathol*, 168: 24-9.
 34. Fort M., Sibila M., Perez-Martin E., Nofrarias M., Mateu E., Segales J. (2009). One dose of a porcine circovirus 2 (PCV2) sub-unit vaccine administered to 3-week-old conventional piglets elicits cell-mediated immunity and significantly reduces PCV2 viremia in an experimental model. *Vaccine*, 27: 4031-7.
 35. Meerts P., Van Gucht S., Cox E., Vandebosch A., Nauwynck H.J. (2005). Correlation between type of adaptive immune response against porcine circovirus type 2 and level of virus replication. *Viral Immunol*, 18: 333-41.
 36. Opriessnig T., Halbur P.G. (2012). Concurrent infections are important for expression of porcine circovirus associated disease. *Virus Res*, 164: 20-32.
 37. Krakowka S., Ellis J.A., McNeilly F., Ringler S., Rings D.M., Allan G. (2001). Activation of the immune system is the pivotal event in the production of wasting disease in pigs infected with porcine circovirus-2 (PCV-2). *Vet Pathol*, 38: 31-42.
 38. Hoogland M.J., Opriessnig T., Halbur P.G. (2006). Effects of adjuvants on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Journal of swine Health and Production*, 14: 7.
 39. Sibila M., Calsamiglia M., Segales J., Blanchard P., Badiella L., Le Dimina M., Jestin A., Domingo M. (2004). Use of a polymerase chain reaction assay and an ELISA to monitor porcine circovirus type 2 infection in pigs from farms with and without postweaning multisystemic wasting syndrome. *Am J Vet Res*, 65: 88-92.
 40. Rose N., Opriessnig T., Grasland B., Jestin A. (2012). Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 164: 78-89.
 41. Sinha A., Shen H.G., Schalk S., Beach N.M., Huang Y.W., Meng X.J., Halbur P.G., Opriessnig T. (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) influences infection dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) subtypes PCV2a and PCV2b by prolonging PCV2 viremia and shedding. *Vet Microbiol*, 152: 235-46.
 42. Martin H., Le Potier M.F., Maris P. (2008). Virucidal efficacy of nine commercial disinfectants against porcine circovirus type 2. *Vet J*, 177: 388-93.
 43. Andraud M., Rose N., Grasland B., Pierre J.S., Jestin A., Madec F. (2009). Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: a modelling approach. *Prev Vet Med*, 92: 38-51.
 44. Maes D., Van Soom A., Appeltant R., Arsenakis I., Nauwynck H. (2016). Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology*, 85: 27-38.
 45. Chae C. (2012). Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: efficacy and clinical application. *Vet J*, 194: 151-7.
 46. Karuppannan A.K., Opriessnig T. (2017). Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses*, 9.
 47. Ellis J. (2014). Porcine circovirus: a historical perspective. *Vet Pathol*, 51: 315-27.
 48. Alarcon P., Rushton J., Nathues H., Wieland B. (2013). Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms. *Prev Vet Med*, 110: 103-18.
 49. Beach N.M., Meng X.J. (2012). Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Res*, 164: 33-42.
 50. Fraile L., Grau-Roma L., Sarasola P., Sinovas N., Nofrarias M., Lopez-Jimenez R., Lopez-Soria S., Sibila M., Segales J. (2012). Inactivated PCV2 one shot vaccine applied in 3-week-old piglets: improvement of production parameters and interaction with maternally derived immunity. *Vaccine*, 30: 1986-92.
 51. Dvorak C.M., Yang Y., Haley C., Sharma N., Murtaugh M.P. (2016). National reduction in porcine circovirus type 2 prevalence following introduction of vaccination. *Vet Microbiol*, 189: 86-90.
 52. Ostanello F., Caprioli A., Di Francesco A., Battilani M., Sala G., Sarli G., Mandrioli L., McNeilly F., Allan G.M., Prosperi S. (2005). Experimental infection of 3-week-old conventional colostrum-fed pigs with porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus. *Vet Microbiol*, 108: 179-86.
 53. Dvorak C.M.T., Payne B.J., Seate J.L., Murtaugh M.P. (2018). Effect of Maternal Antibody Transfer on Antibody Dynamics and Control of Porcine Circovirus Type 2 Infection in Offspring. *Viral Immunol*, 31: 40-46.
 54. Pejsak Z., Podgorska K., Truszcynski M., Karbowiak P., Stadejk T. (2010). Efficacy of different protocols of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) in a farm affected by postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33: e1-5.
 55. Pejsak Z., Kusior G., Pomorska-Mol M., Podgorska K. (2012). Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV2 on reproductive parameters. *Pol J Vet Sci*, 15: 37-42.
 56. Oropenza-Moe M., Oropenza Delgado A.J., Framstad T. (2017). Porcine circovirus type 2 associated reproductive failure in a specific pathogen free (SPF) piglet producing herd in Norway: a case report. *Porcine Health Manag*, 3: 25.
 57. Opriessnig T., Patterson A.R., Madson D.M., Pal N., Ramamoorthy S., Meng X.J., Halbur P.G. (2010). Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination. *Vet Microbiol*, 142: 177-83.

58. Feng H., Segales J., Fraile L., Lopez-Soria S., Sibila M. (2016). Effect of high and low levels of maternally derived antibodies on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection dynamics and production parameters in PCV2 vaccinated pigs under field conditions. *Vaccine*, 34: 3044-3050.
59. Oh Y., Seo H.W., Park C., Chae C. (2014). Comparison of sow and/or piglet vaccination of 3 commercial porcine circovirus type 2 (PCV2) single-dose vaccines on pigs under experimental PCV2 challenge. *Vet Microbiol*, 172: 371-80.
60. Seo H.W., Lee J., Han K., Park C., Chae C. (2014). Comparative analyses of humoral and cell-mediated immune responses upon vaccination with different commercially available single-dose porcine circovirus type 2 vaccines. *Res Vet Sci*, 97: 38-42.
61. Chae C. (2016). Porcine respiratory disease complex: Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus, and Mycoplasma hyopneumoniae. *Vet J*, 212: 1-6.
62. Opriessnig T., Madson D.M., Prickett J.R., Kuhar D., Lunney J.K., Elsevier J., Halbur P.G. (2008). Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and PCV2 coinfection. *Vet Microbiol*, 131: 103-14.
63. Park C., Seo H.W., Park S.J., Han K., Chae C. (2014). Comparison of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated lesions produced by co-infection between two genotypes of PCV2 and two genotypes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol*, 95: 2486-94.
64. Park C., Oh Y., Seo H.W., Han K., Chae C. (2013). Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model. *Clin Vaccine Immunol*, 20: 369-76.
65. Martelli P., Ardigo P., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Bonilauri P., Luppi A., Guazzetti S., Caleffi A., Borghetti P. (2013). Concurrent vaccinations against PCV2 and PRRSV: study on the specific immunity and clinical protection in naturally infected pigs. *Vet Microbiol*, 162: 558-71.
66. Seo H.W., Park S.J., Park C., Chae C. (2014). Interaction of porcine circovirus type 2 and Mycoplasma hyopneumoniae vaccines on dually infected pigs. *Vaccine*, 32: 2480-6.
67. Xiao C.T., Harmon K.M., Halbur P.G., Opriessnig T. (2016). PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014-2016. *Vet Microbiol*, 197: 72-77.
68. Lv Q.Z., Guo K.K., Zhang Y.M. (2014). Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes*, 49: 1-10.
69. Opriessnig T., O'Neill K., Gerber P.F., de Castro A.M., Gimenez-Lirolla L.G., Beach N.M., Zhou L., Meng X.J., Wang C., Halbur P.G. (2013). A PCV2 vaccine based on genotype 2b is more effective than a 2a-based vaccine to protect against PCV2b or combined PCV2a/2b viremia in pigs with concurrent PCV2, PRRSV and PPV infection. *Vaccine*, 31: 487-94.
70. Franzo G., Tucciarone C.M., Dotto G., Gigli A., Ceglie L., Drigo M. (2015). International trades, local spread and viral evolution: the case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy. *Infect Genet Evol*, 32: 409-15.
71. Kekarainen T., Gonzalez A., Llorens A., Segales J. (2014). Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinating and non-vaccinating commercial farms. *J Gen Virol*, 95: 1734-42.
72. Huang L.P., Lu Y.H., Wei Y.W., Guo L.J., Liu C.M. (2011). Identification of one critical amino acid that determines a conformational neutralizing epitope in the capsid protein of porcine circovirus type 2. *BMC Microbiol*, 11: 188.
73. Kekarainen T., McCullough K., Fort M., Fossum C., Segales J., Allan G.M. (2010). Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol*, 136: 185-93.
74. Fort M., Sibila M., Nofrarias M., Perez-Martin E., Olvera A., Mateu E., Segales J. (2012). Evaluation of cell-mediated immune responses against porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins after vaccination with a commercial PCV2 sub-unit vaccine. *Vet Immunol Immunopathol*, 150: 128-32.
75. Jeong J., Park C., Choi K., Chae C. (2015). Comparison of three commercial one-dose porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccines in a herd with concurrent circulation of PCV2b and mutant PCV2b. *Vet Microbiol*, 177: 43-52.
76. Xiao C.T., Halbur P.G., Opriessnig T. (2015). Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d. *J Gen Virol*, 96: 1830-41.
77. Matzinger S.R., Opriessnig T., Xiao C.T., Catanzaro N., Beach N.M., Slade D.E., Nitzel G.P., Meng X.J. (2016). A chimeric virus created by DNA shuffling of the capsid genes of different subtypes of porcine circovirus type 2 (PCV2) in the backbone of the non-pathogenic PCV1 induces protective immunity against the predominant PCV2b and the emerging PCV2d in pigs. *Virology*, 498: 82-93.
78. Feng H., Blanco G., Segales J., Sibila M. (2014). Can Porcine circovirus type 2 (PCV2) infection be eradicated by mass vaccination? *Vet Microbiol*, 172: 92-9.
79. Velasova M., Alarcon P., Werling D., Nevel A., Wieland B. (2013). Effectiveness of porcine circovirus type 2 vaccination in reducing the severity of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *Vet J*, 197: 842-7.
80. Steiner E., Balmelli C., Gerber H., Summerfield A., McCullough K. (2009). Cellular adaptive immune response against porcine circovirus type 2 in subclinically infected pigs. *BMC Vet Res*, 5: 45.
81. Fort M., Sibila M., Nofrarias M., Perez-Martin E., Olvera A., Mateu E., Segales J. (2010). Porcine circovirus type 2 (PCV2) Cap and Rep proteins are involved in the development of cell-mediated immunity upon PCV2 infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 137: 226-34.
82. Koinig H.C., Talker S.C., Stadler M., Ladinig A., Graage R., Ritzmann M., Hennig-Pauka I., Gerner W., Saalmuller A. (2015). PCV2 vaccination induces IFN-gamma/TNF-alpha co-producing T cells with a potential role in protection. *Vet Res*, 46: 20.
83. Ferrari L., Borghetti P., De Angelis E., Martelli P. (2014). Memory T cell proliferative responses and IFN-gamma productivity sustain long-lasting efficacy of a Cap-based PCV2 vaccine upon PCV2 natural infection and associated disease. *Vet Res*, 45: 44.
84. Kekarainen T., Segales J. (2015). Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution. *Porcine Health Manag*, 1: 17.
85. Santos M.R., Assao V.S., Santos F.A.A., Salgado R.L., Carneiro A.P., Fietto J.L.R., Bressan G.C., de Almeida M.R., Lobato Z.I.P., Ueira-Veira C., Goulart L.R., Silva-Junior A. (2018). Utilization of phage display to identify antigenic regions in the PCV2 capsid protein for the evaluation of serological responses in mice and pigs. *Arch Virol*, 163: 1877-1887.
86. Lekcharoensuk P., Morozov I., Paul P.S., Thangthumniyom N., Wajjawalku W., Meng X.J. (2004). Epitope mapping of the major capsid protein of type 2 porcine circovirus (PCV2) by using chimeric PCV1 and PCV2. *J Virol*, 78: 8135-45.
87. Zhang G., Cheng G., Jia P., Jiao S., Feng C., Hu T., Liu H., Du Y. (2017). The Positive Correlation of the Enhanced Immune Response to PCV2 Subunit Vaccine by Conjugation of Chitosan Oligosaccharide with the Deacetylation Degree. *Mar Drugs*, 15.
88. Chen Y., Song T., Xiao Y.L., Wan X., Yang L., Li J., Zeng G., Fang P., Wang Z.Z., Gao R. (2018). Enhancement of immune response of piglets to PCV-2 vaccine by porcine IL-2 and fusion IL-4/6 gene entrapped in chitosan nanoparticles. *Res Vet Sci*, 117: 224-232.

Large Animal Review è una rivista bimestrale pubblicata da SIVAR (Società Italiana Veterinari per Animali da Reddito) per l'aggiornamento scientifico dei veterinari che si occupano di animali in produzione zootecnica ed al controllo di filiera nella produzione degli alimenti di origine animale. Gli argomenti di principale interesse per la rivista sono quelli di medicina interna, chirurgia, ostetricia, nutrizione, zootecnica, malattie infettive e parassitarie, igiene ed ispezione degli alimenti, benessere animale, prevenzione e management degli allevamenti.

CONTRIBUTI

Large Animal Review pubblica contributi sotto forma di review, di articoli originali e di case reports; salvo accordi particolari con la redazione, i contributi devono rispettare le caratteristiche sotto indicate.

Review - Sono trattazioni complete di un argomento specifico accompagnate da una esaurente ed aggiornata bibliografia. Gli autori interessati nello scrivere una review possono contattare gli editori di Large Animal Review. Il testo non deve superare i 48.000 caratteri circa (spazi inclusi) ed essere accompagnato da non più di 15 tra figure e tabelle.

Articoli originali - Sono contributi originali in forma estesa o breve relativi alle tematiche della rivista e che presentino elementi di novità ed interesse scientifico. Il testo dell'articolo per esteso non deve superare i 32.000 caratteri (spazi inclusi) ed essere accompagnato da non più 10 tra figure e tabelle. Sono graditi i contributi in forma di articolo breve di un massimo di 16.000 caratteri e non oltre 4 tra figure e tabelle.

Case Report - Possono essere presentati dei casi clinici sul singolo animale o d'allevamento. Il testo del case report non deve superare i 10.000 caratteri (spazi inclusi) ed essere accompagnato da non più 4 tra figure e tabelle.

FORMATO

Tutti i contributi (review, articoli originali, case reports), presentati in un unico file, devono presentare la seguente struttura:

Lingua - Inglese o Italiano.

Titolo - Il titolo del manoscritto deve essere breve ed esplicativo. Nel caso di lavori in italiano il titolo deve essere tradotto anche in lingua inglese. Sotto il titolo vanno riportati cognomi e nomi dei singoli autori (ad esempio, Smith Tom), a seguire vanno indicate le affiliazioni degli stessi, numerate in ordine progressivo. Il corresponding author deve essere identificato con un simbolo accanto al nome (esempio, Smith Tom*) ed il nome completo, l'indirizzo postale, il numero di telefono e l'indirizzo e-mail devono apparire sotto le righe di affiliazione sempre sulla pagina del titolo (esempio, * Corresponding author: Smith Tom, University of...).

Abstract - Sulla seconda pagina del manoscritto deve essere inserito un abstract (in inglese) con una lunghezza compresa da un minimo di 300 ad un massimo di 500 parole. L'abstract deve contenere in modo conciso e chiaro lo scopo del lavoro, i risultati e le conclusioni degli autori. Bibliografia, figure e tabelle non devono essere incluse nell'abstract.

Parole Chiave - Di seguito all'abstract, sempre in lingua inglese, devono essere riportate le parole chiave (key words), da un minimo di 3 ad un massimo di 5, separate tra di loro dal punto e virgola „.”.

Corpo del Testo - I manoscritti degli articoli originali devono presentare il seguente schema: introduzione, materiali e metodi, risultati, discussione, conclusioni, ringraziamenti e bibliografia. Nel caso delle review non è previsto uno schema guida, ma l'argomento deve essere trattato in modo completo e suddiviso in capitoli per renderlo il più chiaro possibile.

Il testo va redatto in Microsoft Word preferibilmente, oppure OpenOffice oppure Rich Text Format, con le linee e pagine numerate consecutive, con carattere Times New Roman 12 punti, margini laterali di 2 centimetri, interlinea singola e non deve superare il numero di caratteri (spazi inclusi) indicato nel paragrafo precedente per ciascun tipo di contributo.

Tabelle e Figure - Le tabelle, i grafici e le immagini devono essere annesse al testo del manoscritto e numerate con numeri arabi e corredate da titoli o didascalie concisi ma sufficientemente dettagliati, in modo che risultino comprensibili senza dovere fare riferimento al testo. Tabelle e figure devono essere posizionate alla fine del manoscritto.

Bibliografia - Le referenze bibliografiche ritenute essenziali (non oltre 30 ad eccezione delle review) devono essere richiamate nel testo con un numero progressivo fra parentesi ed elencate nello stesso ordine numerico nella bibliografia.

Per gli articoli tratti da riviste si dovranno indicare: cognome e iniziale del nome dell'Autore e dei Coautori, anno di pubblicazione, titolo dell'articolo, indicazione abbreviata della rivista (in accordo all'Index Medicus), numero del volume, numero della pagina iniziale e finale. Per citazioni bibliografiche di articoli o capitoli contenuti nei libri di testo, si dovranno indicare: cognome e iniziale del nome dell'Autore e dei Coautori, anno di pubblicazione, titolo del capitolo, titolo del libro, numero del volume (se più volumi), editori, edizione, pagina iniziale e finale del capitolo, casa editrice e sua sede. Si riportano due referenze a titolo di esempio:

- **Journals** - Galey F.D., Terra R., Walker R., Adaska J., Etchebarne M.A., Puschner B., Fisher E., Whitlock R.H., Rocke T., Wiloughby D., Tor E. (2000). Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. *J Vet Diagn Invest*, 12: 204-209.

- **Books** - Gustafson D.P. (1986). *Pseudorabies*. In: *Diseases of swine*, Ed. Dunn H.W., 5th ed., 274-289, Iowa State University Press, Ames, IA.

- **Conferences** - Barbano D. M. (1996). Mozzarella cheese yield: Factors to consider. Page 29 in Proc. Wisconsin Cheese Makers Mtg., Madison. Ctr. Dairy Res., Univ. Wisconsin, Madison.

INVIO

Il manoscritto deve essere sottomesso on-line al seguente link: www.largeanimalreview.com

Per informazioni: Dr. Enrico Fiore - Technical Editor
largeanimalreview@sivarnet.it

Intossicazione da doxiciclina in vitelli di razza Frisona Italiana: descrizione clinica e indagini anatomico-patologiche



ELEONORA COPPOLETTA¹, EDOARDO TUCCIA², EMANUELE INVERNIZZI³, PIETRO RICCABONI²

¹ Centro Clinico Veterinario e Zootecnico Sperimentale, Università degli Studi di Milano,
Via dell'Università 6, 26900 Lodi, Italia

² Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Via dell'Università 6,
26900 Lodi, Italia

³ ATS Milano Città Metropolitana, Distretto Alto Lodigiano, Largo Santa Maria 10,
26866 Sant'Angelo Lodigiano (Lodi), Italia

RIASSUNTO

Nel settembre 2018, in un allevamento di vacche da latte situato in provincia di Milano, l'allevatore, al fine di curare una presunta forma respiratoria, ha somministrato 100 mg/kg di doxiciclina per 5 giorni a 10 vitelli di razza Frisona Italiana, causando la morte di 9 di questi. Il veterinario aziendale è stato chiamato a eseguire l'esame clinico di 6 vitelli, che mostravano gli stessi sintomi di 4 ormai deceduti. Due carcasse sono state sottoposte a necropsia presso il Reparto di Anatomia Patologica dell'Ospedale Veterinario Universitario di Lodi. Il veterinario ha eseguito la necropsia di altri 3 animali in campo e ha raccolto campioni tissutali destinati a indagini istologiche. Gli organi sono stati valutati macroscopicamente e sono stati raccolti campioni di cuore, fegato, reni, lingua e muscoli semitendinoso, semimembranoso, bicipite brachiale, diaframma e intercostali esterni. Dai campioni tissutali, fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono state ottenute sezioni di spessore pari a 5 µm. Queste ultime sono state sottoposte a colorazione standard con Ematossilina-Eosina. Le sezioni di muscolatura scheletrica e di miocardio sono state sottoposte a colorazione di Von Kossa e quelle di rene, di spessore pari a 3 µm, sono state colorate mediante reazione PAS (*Periodic Acid Schiff*). Tutti i campioni sono stati, infine, letti tramite microscopio ottico. La malattia degli animali inclusi in questo studio ha seguito un decorso variabile da acuto a iperacuto. Nell'unico sopravvissuto, la remissione dei sintomi è avvenuta in circa 15 giorni, ma si è reso evidente uno spiccato ritardo di crescita. Tachicardia, tachipnea, letargia e disfagia, a volte associate a secrezione nasale muco-distruttiva, erano i sintomi che si presentavano a due giorni dalla somministrazione del farmaco. In accordo con la letteratura scientifica, le lesioni più significative, sia macroscopiche che microscopiche, si sono verificate a carico di lingua, muscoli scheletrici e cuore. Il presente caso descrive i reperti clinici e anatomico-patologici macroscopici e microscopici riscontrati durante un episodio di intossicazione accidentale da doxiciclina nei vitelli sul campo. La doxiciclina è un antibiotico ad ampio spettro appartenente alla classe delle tetracicline. Il suo uso è molto diffuso per il trattamento delle affezioni respiratorie del vitello, poiché di facile somministrazione. Nell'allevamento del bovino da latte, talvolta, possono crearsi le condizioni per un uso non conforme del farmaco, il quale non viene preceduto dalla visita clinica del veterinario o da eventuali indagini microbiologiche. L'episodio di intossicazione descritto è un esempio eclatante di danno iatrogeno in medicina veterinaria, in cui l'errata interpretazione del foglietto illustrativo del presidio farmacologico, ha determinato la perdita di 10 soggetti, 7 dei quali destinati alla rimonta aziendale.

PAROLE CHIAVE

Vitelli; intossicazione; doxiciclina.

DESCRIZIONE DEL CASO

In un allevamento di vacche da latte di razza Frisona Italiana della provincia di Milano, nel settembre del 2018, si è verificato un picco di mortalità nei vitelli. La consistenza dell'allevamento era di 165 animali, di cui 73 vacche in lattazione. Dieci vitelli (8 femmine e 2 maschi) erano stati trattati dall'allevatore con un presidio farmacologico a base di doxiciclina cloridrato (Doxipan 200 mg/g, Industria Italiana Integratori TREI S.P.A., Viale Corassori 62, Modena, Italia), dissolto nel latte poiché, a suo avviso, presentavano sintomatologia respiratoria riferibile a broncopolmonite. Il dosaggio sommini-

strato corrispondeva a 100 mg/kg/die per una durata di 5 giorni, anziché 10 mg/kg/die per 5 giorni come riportato nel foglietto illustrativo. Il veterinario aziendale, interpellato dall'allevatore successivamente alla morte di 4 soggetti, aveva effettuato la visita clinica di altri 6 vitelli (2 maschi e 4 femmine) che mostravano la medesima sintomatologia di quelli già deceduti. I segni clinici più frequentemente riscontrati, comparsi a partire dal secondo giorno dopo la somministrazione del farmaco, erano letargia, decubito da prolungato a permanente, inappetenza e paralisi della lingua associata a gradi variabili di disfagia. All'esame obiettivo particolare dell'apparato cardiocircolatorio erano rilevabili tachicardia, associata ad aritmia, soffio olosistolico di 3° grado e polso debole. L'esame obiettivo particolare dell'apparato respiratorio evidenziava tachipnea e respiro discordante. Alcuni vitelli mostravano tosse spontanea, talvolta associata a scolo nasale bilaterale

Corresponding Author:
Eleonora Coppoletta (eleonora.coppoletta@unimi.it).

muco-purulento. In due soggetti era presente algia diffusa alla palpazione muscolare. La patologia ha seguito decorso acuto in 4 animali, con decesso in settima giornata, e in un altro iperacuto, con decesso in quinta giornata, in assenza di sintomatologia apparente. Un solo animale è sopravvissuto e la remissione dei sintomi è avvenuta in circa 15 giorni, ma successivamente ha manifestato uno spiccato ritardo di crescita.

ESAME ANATOMOPATOLOGICO MACROSCOPICO

Dei 6 vitelli sottoposti a visita clinica da parte del veterinario aziendale, 2 sono deceduti inizialmente e sono stati conferiti al Reparto di Anatomia Patologica dell’Ospedale Veterinario Universitario di Lodi per essere sottoposti all’esame necroscopico. Il veterinario aziendale ha poi eseguito in campo la necroscopia di altri 3 vitelli, deceduti successivamente conferendo, su indicazione del patologo, campioni tissutali di cuore, fegato, reni, lingua e dei muscoli semitendinoso, semimembranoso, bicipite brachiale, diaframma e intercostali esterni. Tutti i soggetti esaminati presentavano quadri anatomico-patologici sovrapponibili, con alcune peculiarità individuali. All’esame esterno, lo stato di nutrizione era scadente e la disidratazione marcata, con evidente infossamento del globo oculare. La muscolatura scheletrica appariva diffusamente pallida e asciutta. All’apertura della cavità addominale, le anse digiunali erano moderatamente distese, edematose e ipemiche. La capsula adiposa renale presentava atrofia gelatinosa. All’apertura della cavità toracica, il polmone era caratterizzato da porzioni localmente estese di consolidamento e marcata iperemia del parenchima; in sezione era evidente gemizio di materiale purisimile. A livello cardiaco si rendevano evidenti bande di decolorazione che, perpendicolarmente al

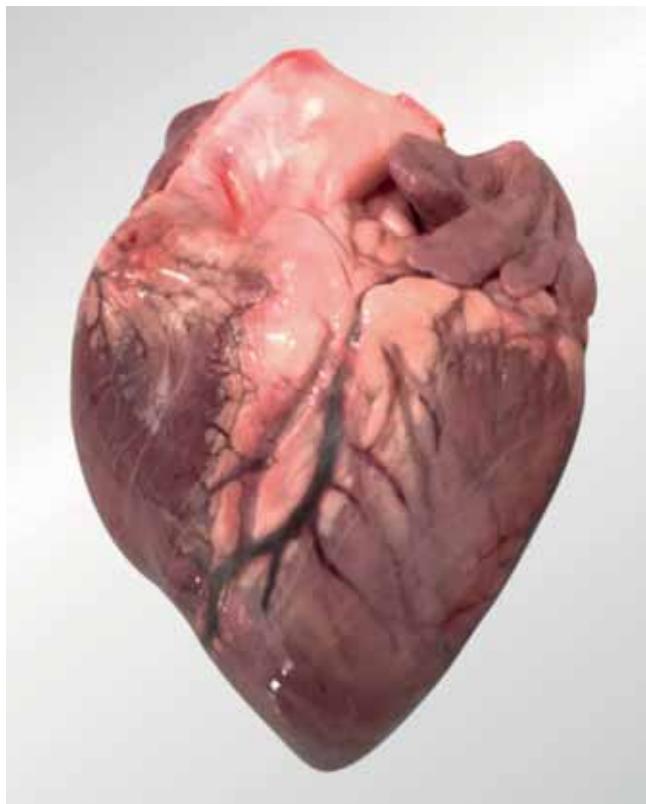


Figura 1 - Cuore. Presenza di bande di decolorazione che, perpendicolarmente al solco coronarico, si spingono nel ventricolo sinistro.

solco coronarico, raggiungevano il ventricolo sinistro fino all’apice (Figura 1). Aree di aspetto irregolare bianco-giallastre, friabili, asciutte e compatte erano visibili, in sezione, a carico delle regioni sub-epicardiche e sub-endocardiche del ventricolo sinistro, di quello destro, e del setto interventricolare (Figura 2A), meglio visibili dopo fissazione (Figura 2B).

ESAME ISTOPATOLOGICO

Tutti i campioni tissutali sono stati fissati in formalina tamponata e inclusi in paraffina mediante inclusore Sakura®Tissue-Tek®VIP®; sono state quindi ottenute sezioni di 5 µm, mediante microtomo rotativo Leica RM2125RT, colorate con Ematossilina-Eosina. Le sezioni di muscolatura scheletrica e di miocardio sono state sottoposte a colorazione di Von Kossa e quelle di rene, di spessore di 3 µm, sono state colorate mediante reazione PAS (*Periodic Acid Schiff*). La lettura è stata effettuata mediante microscopio ottico Olympus BX51 e le immagini acquisite con sistema digitale Olympus DP70. Anche i reperti istologici risultavano sovrapponibili in tutti i soggetti esaminati. Le fibre muscolari della lingua presentavano moderata infiltrazione linfoplasmacellularare, diffusa ialinosi e stampi trombotici intravasali contenenti cellule infiammatorie. Erano inoltre presenti diffusi reperti di calcificazione distrofica delle fibre muscolari degenerate (Figura 3B). I campioni di polmone permettevano di evidenziare marcata ipere-



Figura 2 - Cuore, sezioni trasversali. **A)** La muscolatura a ridosso delle regioni sub-epicardiche e sub-endocardiche del ventricolo sinistro, del ventricolo destro e del setto interventricolare mostra aree di aspetto irregolare, friabili e bianco-giallastre. **B)** Aspetto delle medesime lesioni dopo fissazione in formalina tamponata.

mia e gravi reperti di broncopolmonite catarral-purulenta acuta, con alveoli atelettasici e reperti di bronco-inalazione. Le sezioni miocardiche erano caratterizzate dalla presenza di miocardite interstiziale e di infiltrato infiammatorio linfoplasmacellulare, che a tratti raggiungeva il sistema di conduzione. Nelle regioni sub-endocardiche e sub-pericardiche estese erano le aree di degenerazione delle fibre, caratterizzate da ialinosi e necrosi cerea, talvolta con infiltrazione infiammatoria linfoplasmacellulare e istiocitaria. In corrispondenza di tali focolai era possibile riscontrare grave e diffusa calcificazione distrofica (Figura 3A). In tutte le sezioni di fegato esaminate si rinvenivano infiltrati linfoplasmacellulari degli spazi portali, moderata iperemia e marginazione intravasale leucocitaria. A carico dei reni, in due campioni, si rilevavano diffusa necrosi tubulare acuta e cilindri ialini. La colorazione PAS evidenziava multifocale presenza di proteine a livello tubulare (Figura 4A). La degenerazione a carico del muscolo scheletrico era caratterizzata da ialinosi e necrosi cerea multifocale, con fibroplasia e calcificazione distrofica (Figura 4B).

DISCUSSIONE

La doxiciclina è una molecola chemioterapica ad ampio spettro appartenente alla classe delle tetracicline. La sua formulazione commerciale in polvere, da disciogliere nel latte o nei suoi sostituti, la rende facilmente somministrabile per via

orale e spesso risulta, dunque, la prima scelta per il trattamento delle affezioni respiratorie del vitello sostenute da *Pasteurella multocida* e *Mannheimia haemolytica*¹. A differenza delle tetracicline di più vecchia generazione, è caratterizzata da elevata lipofilia e rapida distribuzione tissutale^{2,3}. Il legame della molecola con gli atomi di Ca⁴ è la causa del danno a livello di fibra muscolare striata cardiaca e scheletrica^{5,6,7,8}. La manifestazione clinica del sovradosaggio di doxiciclina nel vitello insorge 2-5 giorni dopo la somministrazione⁶ ed è caratterizzata da ottundimento del sensorio, anorexia, sciallorrea, tachicardia e dispnea e, nel 20-25% dei casi, *exitus* dopo il 5° giorno^{8,7}. I dosaggi necessari per indurre la tossicità variano da 3 a 10 volte quello raccomandato^{8,7,5,6}. La letteratura scientifica riporta diversi casi di intossicazione accidentale da doxiciclina nel vitello^{5,6,1,7,8}, ma solo due sono i lavori sperimentali, uno nel vitello⁹ e uno nel topo¹⁰. L'insorgenza della sintomatologia nei soggetti inclusi nel presente caso clinico è in accordo con quanto precedentemente descritto^{7,1,6}. Le lesioni istopatologiche degenerative a carico della lingua, sovrapponibili a quelle riportate in precedenza⁶, sono state ritenute la causa della disfagia. L'infiltrato infiammatorio linfoplasmacellulare delle fibre muscolari della lingua, presente anche a livello miocardico, può suggerire che le lesioni di entrambi gli organi siano contemporanee. Tale reperto risulta in disaccordo con i precedenti studi, in cui la lingua viene considerata un *target* precedente rispetto al miocardio⁶. Le lesioni cardiache giustificano l'insufficienza acuta d'orga-

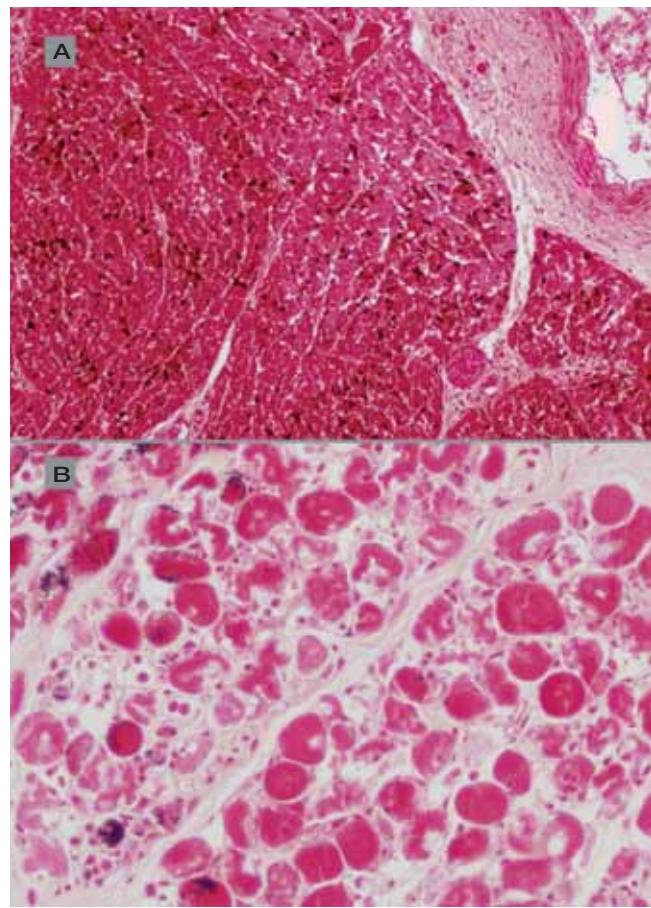


Figura 3 - Sezioni istologiche. A) Cuore. Aree multifocali di calcificazione distrofica a carico delle fibre miocardiche degenerate. Von Kossa, 10x. B) Lingua. Multifocali aree di calcificazione distrofica a carico delle fibre muscolari degenerate. Von Kossa, 40x.

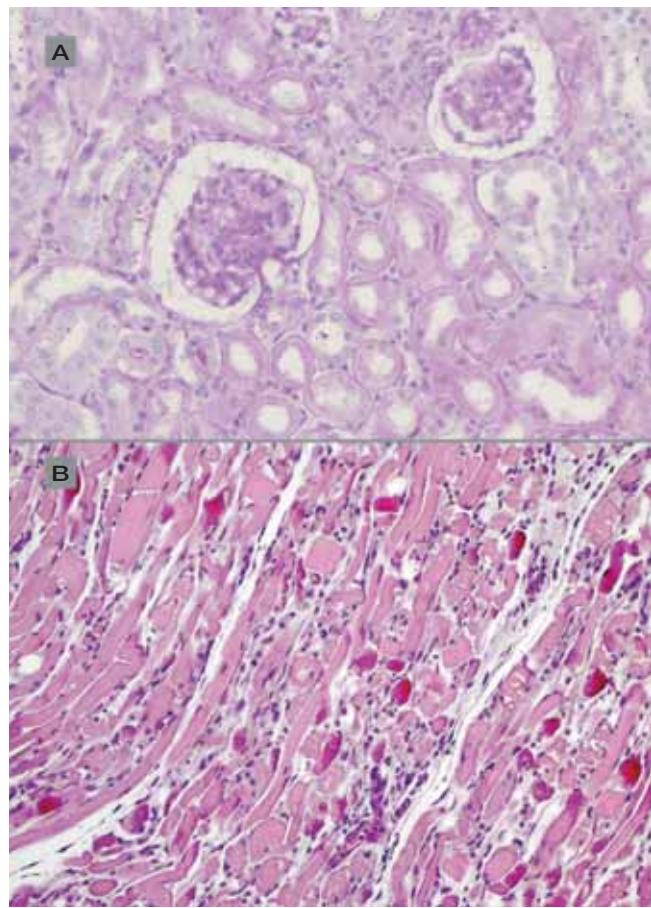


Figura 4 - Sezioni istologiche. A) Rene. Presenza di materiale PAS positivo all'interno dei tubuli e diffusi reperti di necrosi dell'epitelio tubulare che mantiene la connessione con la membrana basale del tubulo stesso. PAS, 25x. B) Muscolo semitendinoso. Evidenti reperti di degenerazione ialina delle fibre muscolari e di necrosi di Zenker. EE, 10x.

no, causa ultima del decesso di tutti i soggetti. Le analoghe lesioni delle fibre muscolari scheletriche spiegano il decubito manifestato da 4 soggetti. Tanto nei vitelli considerati, quanto nei casi descritti in letteratura^{7,1,6}, era presente una grave sintomatologia respiratoria. L'edema polmonare, cui viene in tal senso attribuito un ruolo importante^{7,1,6}, non era presente, ma erano tuttavia significativi i quadri degenerativi della muscolatura diaframmatica e intercostale esterna, nonché broncopolmonite *ab ingestis*. La necrosi tubulare acuta era stata documentata nel bovino solo una volta⁶. La doxiciclina non ha escrezione primaria renale ma enterica, quindi il danno a questo livello non è imputabile ad un'azione tossica diretta, ma alla ridotta perfusione renale, dovuta al danno cardiaco^{11,12}. La normativa vigente¹³ prevede che i medicinali veterinari contenenti antimicrobici da somministrarsi attraverso l'alimento non possano essere oggetto di scorta; tuttavia, all'allevatore ne è concessa la detenzione di un quantitativo ridotto, commisurato ad un trattamento di durata non superiore ai 7 giorni, per eventuali terapie d'urgenza¹⁴. La crisi economica, anche nel settore dell'allevamento del bovino da latte, comporta la riduzione delle risorse destinate alla cura degli animali, in particolare quelli improduttivi come i vitelli¹⁵. In situazioni di emergenza si possono pertanto creare i presupposti per un uso non conforme del farmaco, che non viene preceduto dalla visita clinica da parte del medico veterinario, né da indagini microbiologiche. I danni iatrogeni in medicina veterinaria comprendono quelli commessi dal medico veterinario e quelli imputabili al personale di stalla. Il presente episodio di intossicazione ne rappresenta un chiaro esempio, nel quale un errore di interpretazione del foglietto illustrativo ha determinato la perdita di 10 soggetti, 7 dei quali destinati alla rimonta aziendale.

■ Doxycycline intoxication in Italian Friesian calves: clinical description and pathological investigations

SUMMARY

Doxycycline is a broad-spectrum antibiotic belonging to the tetracycline class. Its use is widespread in cattle breeding for the treatment of the bovine respiratory disease in calves, because it is easy to be administered orally. Moreover, a powder formulation is provided for doxycycline, which makes it easy to be dissolved in milk or its substitutes. In September 2018, in a dairy cattle farm in the province of Milan, the farmer, in order to treat a presumed respiratory disease, administered 100 mg/kg of doxycycline for 5 days to 10 Italian Fresian calves, causing the death of 9 of them. After the death of 4 animals, the veterinarian practitioner performed the full clinical examination of 6 calves that showed the same symptoms as those already dead. Two carcasses were subjected to necropsy at the Department of Pathology of the Veterinary Teaching Hospital in Lodi. The veterinarian practitioner performed the necropsy of 3 animals on field, and collected tissue samples for histological investigation. The organs were evaluated macroscopically and samples of heart, liver, kidneys, tongue and muscles semitendinosus, semimembranosus, biceps brachialis, diaphragm and external intercostals were collected. The formalin-fixed samples were trimmed and embedded. After the inclusion, 5 µm sections were mounted on suitable slides. Histological examination was performed using the standard Hematoxylin-

Eosin staining. Calcium deposits in the skeletal and myocardial musculature were observed with Von Kossa staining. The kidney sections were stained using the Periodic Acid Schiff reaction. Stained samples were read with an optical microscope. The disease of the animals included in this study followed a variable course from acute to hyperacute. In the only survivor, symptom remission occurred in about 15 days, but a marked growth retardation became evident. Tachycardia, tachypnea, lethargy and dysphagia, sometimes associated with mucus-purulent nasal discharge, were the symptoms occurring two days after the drug administration. According to the scientific literature, the most frequent lesions, both macroscopic and microscopic, were found in tongue, skeletal muscles and heart. This paper describes the clinical and the macroscopic and microscopic pathological findings during an accidental doxycycline overdose outbreak in calves in the field. In livestock farming, drugs might be improperly administrated without veterinarian clinical examination, or any microbiological investigations, causing unpredictable consequences that cannot be managed by the farmer. The episode of intoxication reported in this paper is a striking example of a iatrogenic disease, in which a misinterpretation of the package leaflet led to the loss of 10 subjects, including 7 which were intended to restock the herd.

KEY WORDS

Calves; intoxication; doxycycline.

Bibliografia

- Chiers K., Weyens P., Deprez P., Van Heerden M., Meulemans G., Baert K., Croubels S., De Backer P., Ducatelle R. (2004). Lingual and pharyngeal paralysis due to acute doxycycline intoxication in veal calves. *Vet Rec.* 155, 25-26.
- Aronson A.L. (1980). Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *J Am Vet Med Assoc.* 176, 1061-1068.
- Riond JL, Riviere JE. (1988). Pharmacology and toxicology of doxycycline. *Vet Hum Toxicol.* 30, 431-443.
- Gyrd-Hansen N., Rasmussen F., Smith M. (1981). Cardiovascular effects of intravenous administration of tetracycline in cattle. *J Vet Pharmacol Ther.* 4, 15-25.
- Brihoum M., Amory H., Desmecht D., Rollin F. (2004). Doxycycline poisoning in calves: 18 cases in Belgium. Page 102 in Proc. of the 23rd World Buiatrics Congress, Quebec City, Canada.
- Brihoum M., Amory H., Desmecht D., Cassart D., Deleuze S., Rollin F. (2010). Descriptive study of 32 cases of doxycycline-overdosed calves. *J Vet Intern Med.* 24, 1203-1210.
- Yeruham I., Perl S., Sharony D., Vishinsky Y. (2002). Doxycycline toxicity in calves in two feedlots. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 49, 406-408.
- Zeeuwen A.A., Van Exsel A.C., Jaartsveld F.H., Wentink G.H. (1993) Doxycycline poisoning in veal calves. *Tijdschr. Dier- geneeskdt.* 118, 803.
- Brihoum M., Rollin F., Desmecht D., Detilleux J., Amory H. (2011). Clinical evaluation of cardiac effects of experimental doxycycline overdosing in healthy calves. *BMC Vet Res.* 7, 40.
- El-Newehy M.S. (2013). Experimental doxycycline overdose in rats causes cardiomyopathy. *Int J Exp Path.* 94, 109-114.
- Newman S.J., Confer A.W., Penceira R.J. (2007). Urinary system. In: *Pathologic basis of veterinary disease*, Ed. McGavin M.D., 4th ed., 613-619, Mosby Elsevier, St Louis, Missouri, USA.
- Maxie G.M., Newman S.J. (2007). Urinary system. In: *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals*, Ed. Maxie M.G., 5th ed., 425-522, Saunders Elsevier, Edinburgh, Scotland.
- Decreto Legislativo 6 aprile 2006, n. 193, art. 81. Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari.
- Decreto Legislativo 24 luglio 2007, n. 143, art. 1. Disposizioni correttive ed integrative del decreto legislativo 6 aprile 2006, n. 193, concernente il codice comunitario dei medicinali veterinari, in attuazione della direttiva 2004/28/CE.
- Sala G., Boccardo A., Fantinato E., Coppoletta E., Bronzo V., Riccaboni P., Belloli A.G., Pravetttoni D. (2019). Retrospective analysis of iatrogenic diseases in cattle requiring admission to a veterinary hospital. *Vet Rec Open*, 6: e000254.

CALIER

PER LA GESTIONE OTTIMALE
DELLA RIPRODUZIONE BOVINA
Linea Ormonali

SINCRONIZZAZIONE E RIPRODUZIONE



Veteglan®

D-Cloprostenolo
Analogo di sintesi della PGF_{2α}



Per ottimizzare
la sincronizzazione
dell'estro e/o
dell'ovulazione



Veterelin®

Buserelin
GnRH analogo di sintesi



Vetecor®

hCG
Gonadotropina Corionica Umana



Per migliorare le
performance
riproduttive



SUPEROVULAZIONE

Pluset®

FSH + LH

Gonadotropine pituitarie di origine suina



La superovulazione
elevata alla massima
potenza

Le tue scelte si riflettono in nidiata sane per

MASSIMIZZARE il PROFITTO



Con **ReproCyc® ParvoFLEX**
più suinetti sani per nidiata*

NOVITÀ

**ReproCyc®
ParvoFLEX**

**ReproCyc®
PRRS EU**

**Ingelvac
CircoFLEX®**

 Boehringer
Ingelheim

Le schede tecniche sono disponibili presso l'Ufficio Tecnico Boehringer Ingelheim Animal Health Italia S.p.A.
Via Lorenzini, 8 - 20139 Milano - Tel. 02.5355821 - Titolare A.I.C. Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH

FLEX
REPRODUCTIVE

* data on file