

Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift

 **FACULTEIT
DIERGENEESKUNDE**
accredited by EAEVE

MEI - JUNI 2019
VOL. 88 - NR. 3

VERSCHIJNT TWEEMAANDELIJKS
PUBLISHED BIMONTHLY
ISSN 0303 9021
WWW.VDT.UGENT.BE
GENT X

Afgiftekantoor 9099 Gent X
v.u. Luc Peelman
Salisburylaan 133 - B-9820 Merelbeke


**UNIVERSITEIT
GENT**

- FIV en FeLV bij Gentse straatkatten
- Beta-caroteen en vitamine E in de melkveehouderij
- Runderpapillomavirus in een paardencellijn
- Wintercyathostominose bij paarden
- Oculaire manifestaties bij een kat met vermoedelijke pulmonale neoplasië
- Atopische dermatitis bij een hond
- Uniforme voederconversie-formule in de varkenshouderij

XPOVET 2019

BEURS EN CONGRES VOOR DE DIERENARTS

NIEUW!
Vakbeurs en congres
van vrijdag tot zaterdag
op onze nieuwe
toplocatie, **Gent ICC**

VRIJ & ZAT
11 & 12 OKTOBER
GENT ICC

Inspirerende lezingen,
vernieuwende bijscholingen
& kwalitatieve vakbeurs

www.expovet.be



VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT

2019, vol. 88, nr. 3

INHOUD

Prevalentiestudie

- 131 R. VAN VUGT, H. NAUWYNCK, I. POLIS, H. DE ROOSTER
Prevalentiestudie naar het feline immunodeficiëntievirus en feline leukosevirus bij straatkatten in Gent

Prevalence study

- R. VAN VUGT, H. NAUWYNCK, I. POLIS, H. DE ROOSTER
Prevalence study on feline immunodeficiency virus and feline leucosis virus in stray cats in Ghent

Originele artikelen

- 137 J. DE BIE, K. PROOST, H. VAN LOO, J. CALLENS, P.E.J. BOLLS, E. FRANSEN, J.L.M.R. LEROY
Beta-caroteen en vitamine E in de melkveehouderij: factoren die bloedconcentraties beïnvloeden - een veldstudie in Vlaanderen

Original articles

- J. DE BIE, K. PROOST, H. VAN LOO, J. CALLENS, P.E.J. BOLLS, E. FRANSEN, J.L.M.R. LEROY
 β -carotene and vitamin E in the dairy industry: blood levels and influencing factors – a case study in Flanders

- 150 Z. AKKUTAY-YOLDAR, T. OĞUZOĞLU, F. DOĞAN, V. ATASEVEN
Detectie van runderpapillomavirus in een paardencellijn als contaminant

- Z. AKKUTAY-YOLDAR, T. OĞUZOĞLU, F. DOĞAN, V. ATASEVEN
Detection of bovine papillomavirus in an equine cell line as a contaminant

Retrospectieve studie

- 157 L.M. VERHAEGHE, B. PARDON, P. DEPREZ, E. CLAEREBOUT
Diagnostische parameters voor klinische wintercyathostomiose bij paarden

Retrospective study

- L.M. VERHAEGHE, B. PARDON, P. DEPREZ, E. CLAEREBOUT
Diagnostic parameters for clinical larval cyathostomiasis in horses

Casuïstieken

- 164 L. BATALLER-MONTANER, R. TAPIA-NIETO
Oculaire manifestaties en computertomografische bevindingen bij een kat met vermoedelijke angioinvasieve pulmonale neoplasie

Case reports

- L. BATALLER-MONTANER, R. TAPIA-NIETO
Ocular manifestations and CT scan findings in a cat with suspected angioinvasive pulmonary neoplasia

- 168 C. MEERE, S. VANDENABEELE
Therapeutische complicaties en opvolging bij een hond met atopische dermatitis

- C. MEERE, S. VANDENABEELE
Therapeutic complications and follow-up in a dog with atopic dermatitis

Voor de praktijk - Oproep

- 175 I. CHANTZIARAS, J. VAN MEENSEL, S. DE SMET, D. MAES, S. MILLET
Naar een uniforme formule voor voederconversie via participatief onderzoek in de varkenshouderij

Vraag en antwoord

- 177 Noodslachting of euthanasie van runderen

- 162, 179 **Uit het verleden**

Schilderij op coverpagina: Nadie Roels (Mortsel)

Een koe op stal, een beeld dat we tegenwoordig steeds vaker te zien krijgen. Door het toegenomen aantal *melkkoeien* per bedrijf (gemiddeld 47 in 2009 versus 87 in 2018, CRV) is er steeds minder aandacht voor de individuele koe. Om tegemoet te komen aan de noden van elke koe houdt men koeien steeds vaker op stal in plaats van ze te laten grazen op de weide. Op deze manier is er een betere controle op de voederopname, worden bronstsignalen sneller herkend en wordt een koe vaker gemolken. Uiteraard zijn er ook nadelen verbonden aan het houden van koeien op stal. Zo krijgen deze koeien doorgaans meer graskuil in plaats van vers gras. Graskuil bevat echter beduidend minder vitaminen (zoals vitamine E en β -caroteen) dan vers gras. Vandaar dat koeien tegenwoordig vaker kampen met vitaminedeficiënties (cf. pg. 137).

Tekst: Jessie De Bie

VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT

ISSN 0303-9021

<http://vdt.UGent.be>

Hoofdredacteur en verantwoordelijke uitgever: Luc Peelman
Coördinator en eindredacteur: Nadia Eeckhout
Redacteur rubriek “Uit het verleden”: Luc Devriese

Redactiecomité:

P. Bols, B. Broeckx, C. Burvenich, E. Cox, S. Daminet, P. Deprez, W. De Spiegelaere, M. Devreese, L. Devriese, R. Ducatelle, M. Haspeslagh, M. Hesta, K. Houf, J. Laureyns, I. Polis, J. Saunders, L. Van Ham, F. Van Immerseel, A. Van Soom

Druk:

Graphius
Eekhoudriesstraat 67, B-9041 Oostakker

Publiciteit:

Boerenbond – Media-Service, Diestsevest 40, B-3000 Leuven
Tel. 016 28 63 33

Inlichtingen (voor auteurs) en Abonnementen:

Nadia Eeckhout
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
Tel. 09 264 75 13
nadia.eeckhout@UGent.be

Het Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift verschijnt 6 maal per jaar en wordt uitgegeven door de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent.

Voor intekening dient U contact op te nemen met het secretariaat van het tijdschrift: nadia.eeckhout@UGent.be; tel. 09 264 75 13; fax 09 264 77 99. Er zal u een factuur toegestuurd worden van 60 euro (+6% BTW) (abonnees in België) of 80 euro (+6% BTW) (abonnees in het buitenland). Studenten en faculteitspersoneel kunnen genieten van een gunsttarief.

De verantwoordelijkheid voor alle gepubliceerde methoden, materialen en aanbevelingen berust bij de auteurs van de betreffende bijdragen. De redactie en uitgever zijn niet verantwoordelijk voor eventuele letsels of schade als gevolg van toepassingen die daaruit voortvloeien.

Beknpte richtlijnen voor auteurs

Ieder manuscript zal qua inhoud en vorm beoordeeld worden door 2 onafhankelijke personen.

De samenvatting mag niet langer zijn dan 5% van het artikel met een max. van 150 woorden.

De literatuuraangave **in de tekst** dient als volgt te gebeuren: de naam van de auteur(s) en het jaar van publicatie (Voorbeeld: “... werd vroeger aangetoond (Brown, 1975; Brown en Ellis, 1975; Brown *et al.*, 1975)” ofwel “Brown (1975) toonde vroeger aan dan ...”. Er is dus geen cijferaanuiding in de tekst.

In de **literatuurlijst** dienen achtereenvolgens vermeld: namen van auteur(s), initialen van voornamen, jaartal, titel van artikel, naam van tijdschrift, volume, paginering. Voorbeeld: Allan W.R., Rowson L.B., (1973). Control of the mare’s oestrus cycle by prostaglandins. *Journal of Reproduction and Fertility* 33, 539-543.

De referenties zijn alfabetisch gerangschikt. Artikels van dezelfde auteur(s) dienen per jaartal gerangschikt en in de tekst aangeduid te worden als: (1975a, 1975b)... Bij boeken dienen plaats en naam van uitgever vermeld te worden.

Editor-in-chief and publisher: Luc Peelman
Editorial office: Nadia Eeckhout
Editor “History”: Luc Devriese

Editorial board:

P. Bols, B. Broeckx, C. Burvenich, E. Cox, S. Daminet, P. Deprez, W. De Spiegelaere, M. Devreese, L. Devriese, R. Ducatelle, M. Haspeslagh, M. Hesta, K. Houf, J. Laureyns, I. Polis, J. Saunders, L. Van Ham, F. Van Immerseel, A. Van Soom

Printed by:

Graphius
Eekhoudriesstraat 67, B-9041 Oostakker

Advertisements:

Boerenbond – Media-Service, Diestsevest 40, B-3000 Leuven
Tel. 016 28 63 33

Information (for authors) and Subscriptions:

Nadia Eeckhout
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke
Tel. 09 264 75 13
nadia.eeckhout@UGent.be

The ‘Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift’ is published six times per year by the Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University. For subscriptions, please contact the administrative offices of the journal: nadia.eeckhout@UGent.be; tel. 0032 9 264 75 13; fax 0032 9 264 77 99. An invoice of 80 euros (+6% VAT) will be sent.

The responsibility for all methods, materials and recommendations published herein rests solely with the authors of the various contributions. No responsibility is assumed by the editorial staff or publisher for any resulting injury or damage.

More detailed information is available on
www.vdt.ugent.be

Figuren en tabellen dienen contrastrijk te zijn en op afzonderlijke bijlagen te worden ingediend. De figuren moeten een grootte hebben van minstens 200 kb.

Het aantal tabellen en figuren wordt tot een noodzakelijk minimum beperkt.

Voor de figuren dienen titels en teksten gezamenlijk op een apart blad aangebracht te worden.

Overzichtsartikelen mogen niet te uitgebreid zijn (norm: max. 20 getypte bladzijden) en het aantal referenties wordt beperkt gehouden.

De auteurs gaan ermee akkoord dat hun gepubliceerd artikel hergebruikt kan worden, mits vermelding van de bron.

Verdere details kunnen verkregen worden op de redactie of op www.vdt.ugent.be

Prevalentiestudie naar feliene immunodeficientievirus en feliene leukosevirus bij straatkatten in Gent

Prevalence study of feline immunodeficiency virus and feline leucosis virus in stray cats in Ghent

¹R. van Vugt, ²H. Nauwynck, ¹I. Polis, ¹H. de Rooster

¹Vakgroep Kleine Huisdieren,

²Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie,

Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

roy.v.vugt@gmail.com

SAMENVATTING

Het feliene immunodeficientievirus (FIV) en het feliene leukosevirus (FeLV) zijn twee ziekteverwekkers bij de kat die de gezondheid van het dier op lange termijn aantasten. Zwerfkatten vormen een reservoir voor het behoud en de verspreiding van beide virussen tussen wilde dieren en naar gezelschapsdieren.

Stad Gent voert al jarenlang een zwerfkattenbeleid volgens het vangen-castreren-terugplaatsen- (“trap-neuter-return”) principe, waarbij FIV- of FeLV-positief-testende katten geëuthanaseerd worden. Om de invloed van het bestrijdingsplan van Stad Gent op de prevalentie van FIV en FeLV te onderzoeken, werden data van zwerfkatten gevangen in 2009 en 2017 met elkaar vergeleken. Wat FeLV betreft, werd een sterke daling gezien (van 9,9% naar 0,7%). Bij FIV bleven opvallende verschillen uit (9,1% versus 10,3%). Er was ook een verschuiving waarneembaar van zowel het aantal gevangen zwerfkatten als van positief-testende katten van de binnenstad naar de randgebieden. Aanvullend onderzoek is aangeraden om meer factoren in kaart te brengen die de evolutie van FIV en FeLV bij verwilderde katten in de regio Gent bepalen.

ABSTRACT

Feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leucosis virus (FeLV) are two pathogens in cats that may have severe consequences on the general health of the infected animal, especially in the long term. The stray cat population is a reservoir for maintaining the infection in this group but is also responsible for spreading the infection to housecats.

For many years, the City of Ghent has been pursuing a stray cat control policy according to the trap-neuter-return principle that entails euthanasia of stray cats affected by FIV or FeLV. To study the influence of the eradication plan on the prevalence of FIV and FeLV in the stray cat population, data obtained in 2009 were compared to data of 2017. A significant drop in the infection rate was observed for FeLV (from 9.9% to 0.7%). For FIV, the prevalence remained similar (from 9.1% to 10.3%). A shift in the number of stray cats caught as well as in the percentage of positive cases was observed from downtown to the boundaries of the Ghent area. Various factors may have influenced these preliminary findings. Further research should elucidate factors responsible for the evolution of the FIV and FeLV prevalence in stray cats in the Ghent area.

INLEIDING

Feliene immunodeficientievirus (FIV) en feliene leukosevirus (FeLV) zijn retrovirussen die voorkomen bij katten. Door “reverse-transcriptase” kan het virale RNA zich integreren als DNA in het DNA van

de gastheer (Kenyon et al., 2011). Dit heeft tot gevolg dat dieren die ooit in contact zijn gekomen met FIV levenslang besmet blijven (Hartmann, 2012; MacLachlan et al., 2016). Bij contact met FeLV is de afweer van de gastheer bepalend voor het verloop van de ziekte. In geval van verminderde immuniteit is het

mogelijk dat het virus zich in het beenmerg integreert en persisterende viremie veroorzaakt (Hartmann, 2012; MacLachlan et al., 2016).

De klinische symptomen van FIV en FeLV zijn variabel en niet-specifiek. Bij aantasting door FIV worden voornamelijk opportunistische infecties gezien, zoals faryngitis, stomatitis, dermatitis, lage-urine-weginfectie en diarree (Pedersen et al., 1989; Hartmann, 2011; Hartmann 2012; Lappin 2014). Bij een persisterende FeLV-infectie worden frequent neoplasieën waargenomen. Ook anemie, enteritis, peritonitis (FIP), neurologische symptomen en inflammatoire aandoeningen van de luchtwegen worden regelmatig waargenomen (Pedersen et al., 1989; Reinacher, 1989; Hartmann, 2012; Lappin, 2014). De overdracht van beide virussen gebeurt via krab- en bijtincidenten; voor wat FeLV betreft, ook via contact met speeksel bij onder andere vachtverzorging. De virussen zijn aanwezig in de speekselklieren, nasale secreties, feces, melk en urine (Levy et al., 2008). Voor FeLV, zouden er aanwijzingen zijn voor verspreiding via vlooiën, maar de significantie van deze transmissieroute is nog niet bekend (Vobis et al., 2003; Gomes-Keller et al., 2009).

De diagnose van FIV kan gesteld worden met antistof-ELISA via bloedafname. De diagnose van FeLV gebeurt op dezelfde wijze, maar hier worden antigenen opgespoord (Hartmann et al., 2007). De beschikbaarheid van deze diagnostische testen is belangrijk om aangetaste maar (nog) asymptomatische dieren te kunnen identificeren, aangezien ze infectieus zijn voor hun omgeving.

Veel steden hebben een plan ter beteugeling van de populatie zwervkatten. Veelal betreft het een “trap-neuter-return” (TNR)-systeem (UFAW, 1995). Hierbij worden zwervdieren gevangen en gecastreerd om daarna op hun vangplaats terug te worden uitgezet. Het systeem dat in Gent wordt toegepast, is daar een variant van. Katten besmet met FIV en/of FeLV worden geëuthanaseerd in plaats van opnieuw te worden uitgezet. Om de invloed van het bestrijdingsplan op de prevalentie van FIV- of FeLV-infectie te onderzoeken, werd deze studie opgezet.

MATERIALEN EN METHODEN

Sinds vele jaren is er een samenwerkingsovereenkomst tussen Stad Gent en de Vakgroep Kleine Huisdieren van de Faculteit Diergeneeskunde te Merelbeke betreffende zwervkatten in de regio Gent. Bewoners van Gent kunnen melden waar en hoeveel zwervkatten er in hun buurt worden gezien. Medewerkers van de Gezondheidsdienst van Stad Gent trachten deze katten te vangen en brengen ze naar de Faculteit Diergeneeskunde in Merelbeke. De katten worden door laatstejaarsstudenten diergeneeskunde optie gezelschapsdieren onder verdoving gebracht. De dieren worden gecontroleerd op de aanwezigheid van een ID-chip, waarna hun gezondheidstoestand

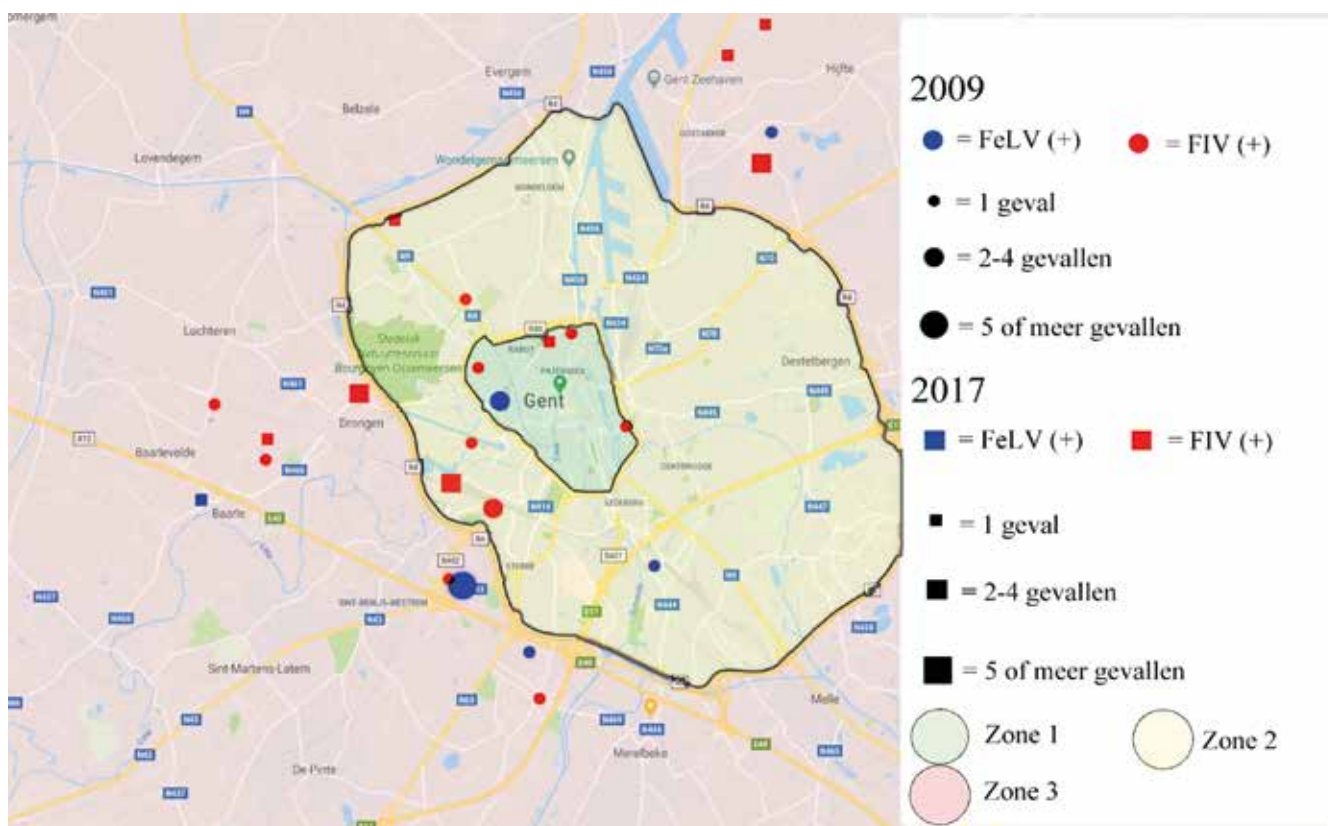
wordt beoordeeld en een bloedstaal wordt afgenomen voor het uitvoeren van een FIV- en FeLV-test (Combo FIV/FELV SNAPtest, Idexx). Wanneer de katten voor beide pathogenen negatief testen, worden de dieren onvruchtbaar gemaakt door castratie. Door een klein driehoekje te knippen uit het linkeroor worden deze dieren levenslang herkenbaar gemaakt. Vervolgens worden ze uitgezet op de plaats waar ze gevangen werden. Katten met ernstige, uitwendig zichtbare ziekteverschijnselen en dieren die positief testen voor één of beide virussen worden geëuthanaseerd.

Van elke aangeboden kat worden gestandaardiseerde gegevens opgeslagen. Voor deze studie werd gebruik gemaakt van de gegevens van katten aangeboden in 2009 of 2017. Er werd eerst gekeken hoeveel katten er in beide jaren binnengebracht werden op de Faculteit Diergeneeskunde. Gegevens over geslacht, gewicht en eventuele dracht werden verzameld. Uit de aangeboden katten werden vervolgens de dieren geselecteerd die positief testten voor FIV en/of FeLV.

Om een beter beeld te krijgen van de verspreiding van het aantal gevangen dieren en, meer specifiek, van FIV- en/of FeLV-positieve gevallen, werd de regio Gent ingedeeld in drie zones. Zone 1 wordt afgegrensd door de R40 (de binnenring), Zone 2 door de R4 (de buitenring) en Zone 3 omvat het gebied buiten de R4 en de resterende gedeelten van de deelgemeenten van Gent (Figuur 1).

Tabel 1. Gegevens over de Gentse zwervkatten gevangen in 2009 en 2017. Het aantal FIV- en FeLV-positieve katten wordt weergegeven per geslacht en per zone. In 2009 werd bij twee katten de vangplaats niet geregistreerd en in 2017 ontbrak deze informatie voor één kat.

	Aantal gevangen Gentse zwervkatten (%)	
	2009	2017
Totaal	121 (100)	146 (100)
FIV ⁺	11 (9,1)	15 (10,3)
FeLV ⁺	12 (9,9)	1 (0,7)
Geslacht		
Mannelijk	52 (100)	83 (100)
FIV ⁺	10 (19,2)	14 (16,9)
FeLV ⁺	4 (7,7)	0 (0)
Vrouwelijk	69 (100)	63 (100)
FIV ⁺	1 (1,4)	1 (1,6)
FeLV ⁺	8 (11,6)	1 (1,6)
Vangplaats		
Zone 1	26 (21,9)	20 (13,8)
FIV ⁺	3 (11,5)	1 (5,0)
FeLV ⁺	2 (7,7)	0 (0)
Zone 2	65 (54,6)	69 (47,6)
FIV ⁺	5 (7,7)	5 (7,2)
FeLV ⁺	9 (13,8)	0 (0)
Zone 3	28 (23,5)	56 (38,6)
FIV ⁺	3 (10,7)	9 (16,1)
FeLV ⁺	1 (3,6)	1 (1,8)



Figuur 1. Locaties van FIV- en FeLV-positieve dieren in 2009 en 2017. De zwarte lijnen geven de grenzen aan tussen de verschillende zones. Zone 1 omvat de binnenstad, zone 2 het gebied binnen de R4 en zone 3 de resterende deelgemeenten en de gemeente Melle. Elke zone is aangeduid in een andere kleur.

RESULTATEN

In 2009 werden 121 katten binnengebracht voor castratie (Tabel 1). Van deze dieren waren er 43,0% (n=52) mannelijk en 57,0% (n=69) vrouwelijk; 16 kattinnen waren drachtig. Vijf dieren (drie katers en twee kattinnen) waren bij het aanbieden reeds gecastreerd maar hadden geen herkenbare oorknip. In totaal was in 2009 19% (n=23) van de 121 katten geïnfecteerd met FIV (n=11) of FELV (n=12). Geen enkel dier werd positief bevonden voor beide virussen tegelijkertijd. Alle FIV-positieve katten met uitzondering van één waren mannelijk en intact, de resterende kat was vrouwelijk en intact. Van de katten geïnfecteerd met FeLV waren er vier mannelijk en intact en acht vrouwelijk en intact, waarvan één drachtig.

Bij twee (negatief-testende) katten kon de vangplaats niet achterhaald worden. In zone 1 werd 21,9% van de katten gevangen (n=26) waarvan 11,5% (n=3) besmet was met FIV en 7,7% (n=2) met FeLV. In zone 2 werd 54,6% (n=65) van de katten gevangen, waarvan 7,7% (n=5) drager was van FIV en 13,8% (n=9) van FeLV. Zeven van de negen FeLV-positieve katten in zone 2 werden op één locatie gevangen (tegelijkertijd werden daar vijf onbesmette katten gevangen en opnieuw uitgezet). In zone 3 ving men 23,5% (n=28) van de katten, waarvan 10,7% (n=3) besmet was met FIV en 3,6% (n=1) met FeLV.

In 2017 werden 146 katten binnengebracht voor castratie. Er waren 56,8% (n=83) mannelijke katten

en 43,2% (n=63) vrouwelijke, waarvan twaalf drachtig. Twaalf dieren zonder herkenbare oorknip (acht katers en vier kattinnen) bleken bij het aanbieden reeds gecastreerd te zijn. In totaal was 11% (n=16) van de dieren geïnfecteerd met FIV (n=15) of FeLV (n=1). Geen enkel dier testte positief voor beide ziekten. Twaalf van de 15 FIV-positieve katten waren mannelijk en intact, twee mannelijk en gecastreerd en de resterende vrouwelijk en intact. De enige kat die geïnfecteerd was met FeLV was vrouwelijk en intact.

Bij één kat, die overigens FIV-positief was, werd de vangplaats onleesbaar genoteerd. Slechts 13,8% (n=20) van de gevangen dieren was afkomstig uit zone 1 en één dier was geïnfecteerd met FIV. In zone 2 werd 47,6% (n=69) van de katten gevangen, waarvan 7,2% (n=5) besmet was met FIV maar geen enkel dier testte positief voor FeLV. In zone 3 werd 38,6% (n=56) van de dieren gevangen, waarvan 16,1% (n=9) van de dieren drager was van FIV en 1,8% (n=1) van FeLV.

In Figuur 1 zijn de gevallen op een kaart aangegeven, met een indeling in zones.

Bij het vergelijken van de gegevens van 2009 en die van 2017 viel op dat in beide jaren een gelijkwaardig aantal zwerfkatten gevangen werd in de regio Gent maar dat de prevalentie aan FeLV sterk was teruggelopen. Een opvallend verschil was dat in 2017 geen enkel geval van FeLV-besmetting in zone 2 werd vastgesteld, terwijl daar in 2009 een hoge prevalentie van positieve gevallen werd aangetroffen.

DISCUSSIE

Het effect van een zwervkattenbeleid op de prevalentie van FIV- en FeLV-positieve zwervkatten in de regio Gent werd nooit eerder bestudeerd. Dat de populatie zwervkatten tussen 2009 en 2017 niet wezenlijk is gedaald maar eerder constant is gebleven, wordt bij een TNR-benadering wellicht niet direct verwacht; het succes van een dergelijke aanpak is echter afhankelijk van verschillende factoren (Levy et al., 2003; Castillo et al., 2003; Levy et al., 2004). Niet-gesteriliseerde nieuwkomers sluiten zich immers regelmatig bij de zwervkattenpopulatie aan. De halvering van het totaal aantal geïnfecteerde dieren in 2017 ten opzichte van 2009 was een bemoedigende bevinding.

In 2012 werd een studie gepubliceerd over de prevalentie van retrovirussen bij zwervkatten in Wallonië, in de regio Ciney. Daar werd in 2010 een eradicatieprogramma opgestart dat vergelijkbaar is met dat van Stad Gent (Garigliani et al., 2012). Voor FeLV werd in Ciney een constant lage prevalentie van onder 1% gezien; er werden echter geen uitgebreide gegevens verzameld. De situatie voor FIV was duidelijk verschillend aangezien nagenoeg één op drie katten drager bleek van FIV. In de eerste drie jaar na de opstart van het TNR-programma met eliminatie van besmette katten werd in deze Waalse zwervkattenpopulatie een afname van de prevalentie van FIV (van 30,5% naar 13,1%) vastgesteld. In deze studie werd aangetoond dat euthanasie van geïnfecteerde dieren in combinatie met een TNR-benadering in relatief korte tijd veelbelovende resultaten kan opleveren. Of deze trend op termijn aanhoudt, kan enkel bestudeerd worden door vervolgpreevalentiestudies in dezelfde regio op te starten, maar een dergelijke studie ontbreekt voorlopig. De vergelijking van de recentste met de oudere cijfers van de Gentse zwervkattenpopulatie onthult een gelijkaardige trend met een daling van het aantal geïnfecteerde dieren van 19% naar 11%, al lijkt het (langetermijn) effect van het gevoerde eradicatiebeleid in regio Gent vooral een invloed te hebben op de prevalentie van FeLV. Hierbij dient echter opgemerkt te worden dat de prevalentie van FIV- en FeLV-positieve katten in de regio Gent in 2009 niet vergelijkbaar is met de prevalentie in de regio Ciney in dezelfde periode. Om die verschillen te kunnen verklaren, is verder onderzoek nodig.

In diverse andere landen werden ook al prevalentiestudies naar FIV en FeLV bij katten uitgevoerd. Uit de resultaten van die studies is af te leiden dat de prevalentie sterk kan verschillen tussen regio's en in de tijd. Bovendien speelt ook de invloed van het type populatie van de onderzochte katten mee, aangezien de betreffende buitenlandse studies niet altijd (uitsluitend) over zwervkatten gingen. Zwervkatten komen meer met soortgenoten in contact en lopen dus een grotere kans om besmet te raken dan de gemiddelde huiskat, waardoor logischerwijze een hogere prevalentie van FIV- en FeLV-besmettingen wordt verwacht

in zwervkattenpopulaties dan in andere (of gemengde) populaties. De oudste twee prevalentiestudies naar retrovirussen bij zwervkatten komen allebei uit Spanje (Arjona et al., 2000; Bandecchi et al., 2006). Er werden 11,3-15,6% FIV-positieve katten aangetroffen en 2,6-8,4% FeLV-positieve katten; deze percentages zijn vergelijkbaar met die in de regio Gent in 2009. Het aantal zwervkatten dat geïnfecteerd is met FIV blijkt groter dan het aantal dieren geïnfecteerd met FeLV, zowel in de literatuur (Arjona et al., 2000; Bandecchi et al., 2006) als in de huidige studie. Hiervoor is geen éénduidige verklaring. Een mogelijke uitleg kan zijn dat de dieren die in contact komen met FeLV niet persistent geïnfecteerd raken of geen viruspartikels uitscheiden (Barrs en Beatty, 2013; Hartmann, 2012). Daar tegenover staat dat dieren die in contact komen met FIV via krab- en bijtincidenten geïnfecteerd raken en het virus kunnen overdragen (Hartmann, 2012). Een nadeel bij het uitvoeren van studies naar straatkatten is dat er geen gegevens verzameld kunnen worden over de leeftijd van de dieren, de medische voorgeschiedenis en andere relevante gegevens met betrekking tot levensstijl. Uit onderzoek blijkt dat jongere katten na contact met andere zwervkatten vaker een persisterende infectie met FeLV doormaken dan oudere dieren (Hoover et al., 1976). Uit een Duits onderzoek bij huiskatten is bovendien gebleken dat de gemiddelde leeftijd van FIV-geïnfecteerde dieren hoger ligt dan van FeLV-geïnfecteerde dieren (Gleich et al., 2009). In hoeverre deze factoren in de voorliggende studie een rol hebben gespeeld, is onbekend, gezien de auteurs geen leeftijdsgegevens van de gevangen dieren hebben kunnen verzamelen.

In de andere gepubliceerde prevalentiestudies was het echter niet de rondzwervende kattenpopulatie die bestudeerd werd en werd een lagere prevalentie van FIV en FeLV vastgesteld. In Noord-Amerika werd een grootschalige prevalentiestudie uitgevoerd, waarbij 18.000 katten gescreend werden in asielen en dierenklinieken (Levy et al., 2006). Bij deze gemengde populatie werd een prevalentie van slechts 2,3% voor FIV en 2,5% voor FeLV vastgesteld. In een meer recente Canadese studie, waarbij katten in asielen en opvangthuizen onderzocht werden, werd een prevalentie van 2,2% voor FIV en 6,2% voor FeLV gezien (Munro et al., 2014). De percentages bij opgevangen katten zonder aanwijsbare eigenaar lijken vergelijkbaar met die bij de huiskatten uit een Duitse studie van Gleich et al. (2009), waarbij een prevalentie van respectievelijk 3,2% en 3,6% werd vastgesteld (Gleich et al., 2009).

Een herhaaldelijk terugkomende risicofactor voor besmetting met feliene retrovirussen is het geslacht (Levy et al., 2006; Gleich et al., 2009; Munro et al., 2014). Bij de Gentse zwervkattenpopulatie lag het percentage FIV-geïnfecteerde dieren bij de mannelijke katten in beide onderzochte jaren meer dan een factor 10 hoger dan bij vrouwelijke dieren. Mogelijke verklaringen zijn het grotere territorium van een man-

nelijk, intact dier, waardoor meer contact mogelijk is met andere dieren, met mogelijke overdracht van het virus. Bovendien zijn katers over het algemeen agressiever tegenover andere soortgenoten dan kattinnen. Daarbij lopen mannelijke, intacte dieren meer risico dan gecastreerde katers (Levy et al., 2006). Uiteraard vormen Gentse zwervkatten zonder oorknip een populatie met nagenoeg uitsluitend intacte dieren. Verassend genoeg werden er in 2009 dubbel zo veel FeLV-positieve, vrouwelijke als mannelijke katten aangeboden en was de enige positief-testende kat in 2017 eveneens vrouwelijk. Dit is vooral te wijten aan één vanglocatie in zone 3, waar zeven FeLV-positieve dieren werden gevangen. Van deze dieren waren er vijf vrouwelijk en twee mannelijk. Dit kan een vertekend beeld geven van de verhoudingen. Verder onderzoek van de tussenliggende jaren zal nodig zijn om meer duidelijkheid te geven over de verhoudingen tussen de geslachten.

In 2009 werd ruim de helft van de positief-testende dieren gevangen in de zone tussen de R40 en de R4 (zone 2). Dit was te wijten aan één locatie met twaalf zwervkatten, waar zeven gevallen van FeLV en één geval van FIV werden aangetroffen. Procentueel gezien waren er in de hele zone 2 trouwens niet noemenswaardig meer katten die besmet waren met FIV of FeLV dan in de andere zones. Het aantal positief-testende dieren is vooral in de zone tussen de R40 en de R4 teruggelopen, terwijl in die zone in 2009 en 2017 een gelijkaardig aantal dieren gevangen werd. Er kan voorzichtig geconcludeerd worden dat euthanasie van de besmette zwervkatten een halt heeft toegeroepen aan de verspreiding van het FeLV-virus in die buurt, aangezien daar in 2017 geen enkele FeLV-positieve kat werd gevangen. Maar gezien in het huidige onderzoek slechts twee jaren opgenomen werden, blijven deze resultaten preliminair. Verder onderzoek van de er tussenliggende jaren zou uitgevoerd moeten worden om na te gaan of deze trend bevestigd kan worden. Bovendien is het onmogelijk om correct in te schatten welk effect het vaccineren van huiskatten heeft op de infectiedruk van FeLV binnen een zwervkattenpopulatie.

Uit de gegevens blijkt ook een verschuiving van zowel het aantal gevangen zwervkatten als het voorkomen van virale infecties van de binnenstad naar de randgebieden. Daar waar er in 2009 nog een aanzienlijk deel van de dieren werd gevangen in de binnenstad, werd er in 2017 nog slechts één dier gevangen dat geïnfecteerd was met FIV. Mogelijke verklaringen voor deze verschuiving kunnen zijn dat katteneigenaars in de binnenstad voorzichtiger zijn met het laten loslopen van de eigen huisdieren, waardoor die minder in de zwervkattenpopulatie terechtkomen en/of dat er meer katten gecastreerd worden. Een afname van het aantal gehouden katten in de binnenstad lijkt eerder onwaarschijnlijk, gezien het globale aantal huiskatten nog steeds een opwaartse trend kent (persoonlijke communicatie Schepen Reynebeau

2.9.2018). Anderzijds kan het gebrek aan een efficiënt zwervkattenprogramma in de omliggende gemeenten resulteren in een influx van nieuwe zwervkatten in de regio Gent.

CONCLUSIE

De resultaten van dit preliminair onderzoek lijken alleszins aan te tonen dat het gevoerde eradicationplan potentieel heeft. Een groot nadeel van de huidige werkwijze (alsook van de klassieke TNR-methode) is dat katten die negatief testten voor FeLV en FIV op het moment van castratie maar alsnog besmet worden op latere leeftijd, niet meer getest worden. Deze gecastreerde dieren worden namelijk herkend aan de markering in het oor, waardoor ze niet opnieuw worden aangeboden en onmiddellijk terug worden vrijgelaten. Anderzijds kan ervan uitgegaan dat eens ze seksueel niet meer actief zijn, ze een lager risico lopen om alsnog besmet te geraken.

DANKBETUIGING

Ik wil mijn huidige werkgevers bedanken omdat zij me de tijd hebben gegeven om aan dit artikel te werken.

REFERENTIES

- Arjona A., Escolar E., Soto I., Barquero N., Martin D., Gomez-Lucia E. (2000). Seroepidemiological survey of infection by feline leukemia virus and immunodeficiency virus in Madrid and correlation with some clinical aspects. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 3448-3449.
- Bandecchi P., Dell'Omodarme M., Magi M., Palamidessi A., Prati M.C. (2006). Feline leukaemia virus (FeLV) and feline immunodeficiency virus infections in cats in the Pisa district of Tuscany, and attempts to control FeLV infection in a colony of domestic cats by vaccination. *Veterinary Record* 158, 555-557.
- Castillo D., Clarke A.L. (2003). Trap/neuter/release methods ineffective in controlling domestic cat "colonies" on public lands. *Natural Areas Journal* 23, 247-253.
- Garigliany M., Jolly S., Dive M., Bayrou C., Berthemin S., Robin P., Godenir R., Petry J., Dahout S., Cassart D. (2016). Risk factors and effect of selective removal on retroviral infections prevalence in Belgian stray cats. *Veterinary Record* 178, 45.
- Gleich S.E., Krieger S., Hartmann K. (2009). Prevalence of feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus among client-owned cats and risk factors for infection in Germany. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, p. 985-992.
- Gomes-Keller M.A., Gönczi E., Grenacher B., Tandon R., Hofman-Lehmann R., Lutz H. (2009). Fecal shedding of infectious feline leukemia virus and its nucleic acids: A transmission potential. *Veterinary Microbiology* 134, 208-217.

- Hartmann K., Griessmayr P., Schulz B., Greene C.E., Vidyashankar A.N., Jarrett O., Egberink H.F. (2007). Quality of different in-clinic test systems for feline immunodeficiency virus and feline leukaemia virus infection. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 9, 439-445.
- Hartmann, K. (2011). Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 143, 190-201.
- Hartmann K. (2012). Clinical aspects of feline retroviruses: A review. *Viruses* 4, 2684-2710.
- Hoover E.A., Olsen R.G., Hardy, Jr. W.D., Schaller J.P., Mathes L.E. (1976). Feline leukemia virus infection: age-related variation in response of cats to experimental infection. *Journal of the National Cancer Institute* 57, 365-369.
- Kenyon J.C., Lever A.M.L. (2011). The Molecular Biology of Feline Immunodeficiency Virus (FIV). *Viruses* 3, 2192-2213.
- Lappin M. R. (2014). Polysystemic viral diseases. In: Nelson R.W., Couto C.G. (editors). *Small Animal Internal Medicine*. Fifth edition, Mosby Elsevier, St. Louis, MO, USA, p. 1347-1350.
- Levy J.K., Gale D.W., Gale L.A. (2003). Evaluation of the effect of a long-term trap-neuter-return and adoption program on a free-roaming cat population. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 222, 42-46.
- Levy J.K., Crawford P.C. (2004). Humane strategies for controlling feral cat populations. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 225, 1354-1360.
- Levy J.K., Scott M., Lachtara J.L., Crawford P.C. (2006). Seroprevalence of feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus infection among cats in North America and risk factors for seropositivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228, 371-376.
- Levy J., Crawford C., Hartmann K., Hofmann-Lehmann R., Little S., Sundahl E., Thayer V. (2008). American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10, 300-316.
- Murphy B. (2016). Retroviridae. In: MacLachlan N.J., Dubovi E.J., Barthold S.W., Swayne D.E., Winton J.R. (editors). *Fenner's Veterinary Virology*. Fifth edition, Academic Press, 125 London wall, London EC2Y 5AS, United Kingdom, p. 269-297.
- Munro H.J., Berghuis L., Lang A.S., Rogers L., Whitney H. (2014). Seroprevalence of feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) in shelter cats on the island of Newfoundland, Canada. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 78, 140-144.
- Pedersen N.C., Yamamoto J.K., Ishida T., Hanssen H. (1989). Feline immunodeficiency virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 21, 111-129.
- Reinacher M. (1989). Diseases associated with spontaneous Feline Leukemia Virus (FeLV) infection in cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 21, 85-95.
- UFAW (Universities Federation for Animal Welfare) (1995). Feral cats - suggestions for control. Third edition, *UFAW Publications*, Herts, Verenigd Koninkrijk.
- Van Rensburg P.J.J., Skinner J.D., Van Aarde R.J. (1987). Effects of feline panleucopaenia on the population characteristics of feral cats on Marion Island. *Journal of Applied Ecology* 24, 63-73.
- Vobis M., D'Haese J., Mehlhorn H., Mencke N. (2003). Evidence of horizontal transmission of feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitology Research* 91, 467-470.

β -carotene and vitamin E in the dairy industry: blood levels and influencing factors – a case study in Flanders

Beta-caroteen en vitamine E in de melkveehouderij: factoren die bloedconcentraties beïnvloeden – een veldstudie in Vlaanderen

¹J. De Bie, ^{1,2}K. Proost, ^{3,4}H. Van Loo, ³J. Callens, ¹P.E.J. Bols, ⁵E. Fransen, ¹J.L.M.R. Leroy

¹ Gamete Research Center, Laboratory for Veterinary Physiology and Biochemistry, Department of Veterinary Sciences, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk, Belgium

² Department of Surgery and Anesthesiology of Domestic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

³ Dierengezondheidszorg Vlaanderen (DGZ), Industrielaan 29, B-8820 Torhout, Belgium

⁴ Department of Obstetrics, Reproduction and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

⁵ StatUa Center for Statistics, University of Antwerp, Prins Boudewijnlaan 43, B-2610 Wilrijk, Belgium

Jessie.debie@uantwerpen.be

ABSTRACT

In this case study performed in Flemish dairy herds, it is shown that lactation stage, farm type (grazing (fresh grass) or zero-grazing) and season are interrelated factors associated with circulating β -carotene (bC) and Vitamin E (VitE) concentrations. The iCheck bC is an easy applicable cow-side test to evaluate a cow's bC status. One third of the dairy cows in the study had deficiencies in circulating bC and VitE, especially cows in early lactation and cows from zero-grazing farms. Fresh grass in the diet could not resolve the early post-partum decline in plasma bC and VitE. However, the bC and VitE statuses of dry cows were significantly better on grazing farms. These findings can help updating antioxidant recommendations since it is clear that there is a need for optimization of antioxidant nutritional management in the Flemish dairy industry in order to feed for optimal dairy cow health.

SAMENVATTING

In deze veldstudie uitgevoerd in de Vlaamse melkveehouderij wordt aangetoond dat factoren, zoals lactatiestadium, bedrijfstype (met of zonder weidegang) en seizoen, geassocieerd zijn met plasma- β -caroteen (bC) en vitamine E (VitE)-concentraties bij melkvee. De iCheck bC is een eenvoudig apparaat waarmee de bC-status van een koe snel en op het bedrijf geëvalueerd kan worden. Een derde van de melkkoeien vertoonde deficiënties in plasma-bC en VitE en dit voornamelijk tijdens de vroege lactatie en op bedrijven zonder weidegang. De opname van vers gras kon de daling in plasma-bC en VitE vroeg na de kalving niet opheffen. De bC- en VitE-status van droogstaande koeien was significant beter bij deze met mogelijkheid tot weidegang. Deze bevindingen kunnen bijdragen tot het herformuleren van de diëtaire antioxidant-aanbevelingen met als doel hoogproductieve melkkoeien in optimale gezondheid te houden.

INTRODUCTION

With the onset of lactation, cows enter a period of negative energy balance (NEB) with increased lipolysis resulting in elevated serum non-esterified fatty acid (NEFA) and β -hydroxybutyrate (BHB) concentrations (Adewuyi et al., 2005). This rapid mobiliza-

tion of body reserves may in turn reduce appetite and thus dry matter intake (Vernon, 2005). Furthermore, this period of increased metabolic demands implies an increase in the production of reactive oxygen species by mitochondria, which are produced as by-products of aerobic metabolism. These changes in oxidative metabolism result in oxidative stress (OS) during

the transition period, and several studies have shown that OS is an incentive for the occurrence of diseases and increases dairy cow susceptibility to suboptimal management, e.g. housing conditions (grazing or stalled), composition of the ration (fresh grass, antioxidant intake) (Bernabucci et al., 2005; Castillo et al., 2005b; Roche, 2006; Sordillo and Aitken, 2009). The total antioxidative capacity of NEB cows is often insufficient (Castillo et al., 2005; De Bie et al., 2014), and may be further reduced by heat stress (Bernabucci et al., 2010) and suboptimal antioxidant uptake through the diet. With fresh grass being the major source of dietary vitamins or antioxidants (AO) such as β -carotene (bC) and vitamin E (VitE) (Ballet et al., 2000), it contributes significantly to the health and antioxidative status of dairy cows. As expanding herd sizes outgrow the 'grazing platform' of a dairy farm, the dairy industry is evolved into zero-grazing systems with increased use of ensiled forages and hay low in vitamins and antioxidants (Reijs et al., 2013; Wilkinson and Rinne, 2018). This, together with the current faster-growing dairy industry and higher-producing animals kept in more intensified dairying, jeopardizes the cow's metabolic health (James, 2012) and might increase the incidence of vitamin and antioxidant deficiencies in the dairy industry. Supplementation guidelines originating from 2001 (NRC) need to be re-evaluated according to the current AO needs in the modern dairy industry (Abuelo et al., 2015). Interventional studies on bC and VitE supplementation are rather univocal confirming that an optimized AO supplementation may positively influence dairy cow health and fertility (Miller et al., 1993; de Onzarza and Engstrom, 2009). Designing ready-to-use AO supplementation protocols is a real challenge due to the lack of a complete understanding of the interrelating factors influencing the AO status of modern high-yielding dairy cows. Moreover, information on the actual bC and VitE statuses of dairy cows (with emphasis on Flanders, the North of Belgium) is lacking, which is valuable information that may contribute to the optimization of the AO status of dairy herds. As such, the authors aimed to: 1) investigate the associations between lactation stage, type of farm (grazing (fresh grass in the diet) or zero-grazing (no fresh grass in the diet)) or season on the one hand and plasma bC and VitE concentrations in dairy cows on the other hand and 2) investigate the current bC and VitE statuses as a measure of the antioxidant status in the dairy industry, using Flanders as a base.

MATERIALS AND METHODS

Selection of dairy farms

Dairy farms in Flanders were invited to participate in a survey to estimate the AO status of high-yielding dairy cows through a call on the website of Dierenge-

zondheidszorg Flanders (DGZ, Drogen, Belgium) in September 2014. Out of 48 interested farms, a total of fourteen were selected, diffusely located in Flanders: seven grazing (presence of fresh grass in the ration) and seven zero-grazing farms (no access to fresh grass). The average Flemish dairy farm in 2015 counted 71 cows and had an annual milk yield per cow of 8,515 kg (Coöperatie Rundvee Verbetering, CRV, 2015). In order to have a representative cohort, only dairy farms with a minimum of fifty lactating animals and a minimum annual milk yield per cow of 8,500 kg were included in the study.

Animals, blood collection and study design

In Figure 1, an overview of the study design is given. All fourteen dairy farms were visited three times: 1) at the beginning of autumn (AUT, Oct-Nov) immediately after the grazing season, 2) at the end of winter (WIN, Feb-Mar) when all cows had been stalled inside for winter and 3) during summer (SUM, Jul-Aug) when cows in grazing farms had access to fresh grass, and day temperatures and temperature humidity indexes (THI) increased (official air temperature and relative humidity at the day of sampling collected from www.meteo.be was used to calculate the THI with <http://www.abstechservices.com/?pages=calc4>). Each visit, five dry cows (DRY, 2-4 weeks before calving), five cows in early lactation (EARLY LACT, 0-3 weeks after calving) and five cows in mid lactation (MID LACT, at the time of artificial insemination \pm 12 weeks after calving) were randomly chosen on each farm. Only multiparous cows were sampled in this study. After disinfecting the skin with 70% ethanol, plasma was sampled from the udder vein in EDTA tubes (BD Vacutainer® K2EDTA, BD, Plymouth, UK) and gently mixed. Serum was sampled in clot activating tubes (BD Vacutainer® SST™ II Avance tubes). After collection, all blood tubes were transported at room temperature and protected from light until further processing.

At the day of blood sampling, the exact number of days after calving, the body condition score (BCS) and parity of each individual cow, and the THI in summer were recorded. In addition, the milk production (mean annual milk yield per cow of each farm) and the average calving interval (CI) of each farm were recorded.

An overview of the composition of the lactation and dry-cow ration (on DM basis) is presented in Table 1. The ration consisted of corn and grass silage, hay, beet pulp, concentrates (and pasture in grazing farms). On grazing-farms, cows were typically allowed on pasture on average 9 hours daily when lactating and 24 hours per day during the dry period. The estimated maximum fresh grass intake of the grazing cows was 6 kg DM/day. During winter, all cows (from grazing- and zero-grazing farms) were stalled inside and did not consume any fresh grass.

The actual intake of fresh grass and other compo-

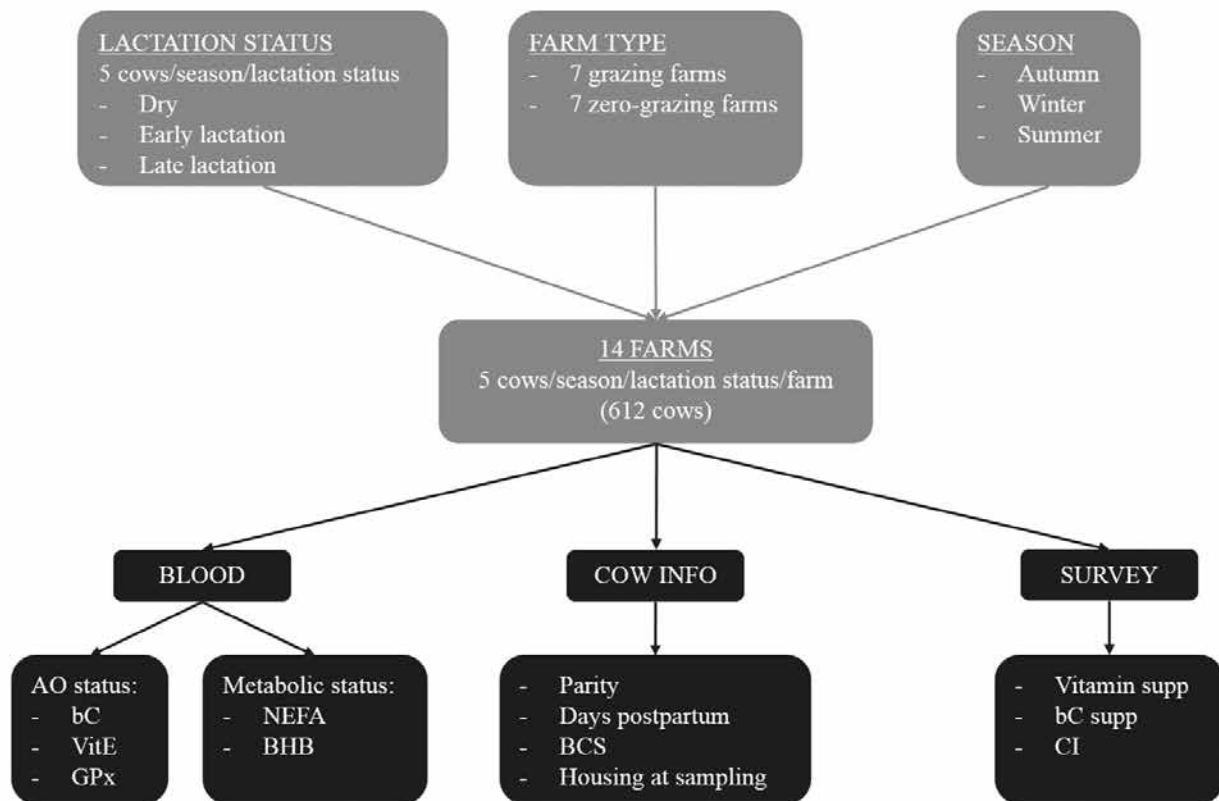


Figure 1. Study design. Boxes in light grey represent input variables, boxes in dark grey represent output variables. Dry = 2-4 w pre-partum, Early lactation = 0-3 w post-partum, Mid lactation = at time of artificial insemination, bC = β -carotene, VitE = Vitamin E, GPx = Glutathione Peroxidase, NEFA = Non-esterified Fatty Acids, BHB = β -hydroxybutyrate, BCS = Body Condition Score, supp = supplementation, CI = Calving Interval.

Table 1. Detailed composition of the lactation (LACT) and dry (DRY) cow ration in autumn (AUT), winter (WIN) and summer (SUM) in zero-grazing and grazing farms. For the LACT ration, the mean total kg dry matter (DM) of all zero-grazing or grazing farms is presented as well as the proportions (%) of each dietary component calculated on the total DM intake. For the DRY ration, the mean kg DM of each dietary component in zero-grazing and grazing farms is presented. The mean hours that cows were allowed on pasture daily in grazing-farms is presented as well.

	LACT			DRY		
	AUT	WIN	SUM	AUT	WIN	SUM
Zero-grazing farms						
Mean total kg DM/d	20.6 kg	23.3 kg	21.0 kg			
DM corn silage	50.1 %	44.7 %	51.2 %	7.0 kg	7.3 kg	7.5 kg
DM grass silage	19.7 %	23.9 %	20.9 %	3.0 kg	2.6 kg	2.5 kg
DM hay	0.0 %	0.5 %	0.3 %	ad libitum	ad libitum	ad libitum
DM beet pulp	7.7 %	10.8 %	8.0 %	0.7 kg	0.4 kg	0.0 kg
DM concentrates	22.5 %	20.1 %	19.6 %	0.5 kg	0.4 kg	0.7 kg
Grazing farms						
Mean total kg DM/d (excl. fresh grass)	17.3 kg	20.2 kg	15.0 kg			
DM corn silage	44.1 %	44.9 %	46.8 %	5.9 kg	4.4 kg	4.1 kg
DM grass silage	21.7 %	25.6 %	13.9 %	1.5 kg	1.8 kg	2.0 kg
DM hay	0.2 %	1.2 %	0.0 %	ad libitum	ad libitum	ad libitum
DM beet pulp	10.1 %	6.5 %	10.5 %	0.0 kg	0.0 kg	0.0 kg
DM concentrates	23.8 %	21.9 %	28.8 %	0.0 kg	0.0 kg	0.0 kg
Mean hours allowed on pasture/d	8.8	0.0	8.2	24.0	0.0	24.0

Table 2. Linear mixed model building. Significant predictors in the linear mixed models for each of the five outcome parameters (bC, VitE, GPx, logNEFA and logBHB) are presented. No P-values for main effects are shown if the factor lactation stage (LactStage), type of farm (FarmType) or Season was part of a significant interaction (Int) term (although the main effect term itself was kept in the regression model). For each outcome parameter, non-significant factors ($P > 0.05$; N.S.) were removed from the model, as described in the methods section.

Linear mixed model		bC	VitE	GPx	logNEFA	logBHB
Int	P(LactStage*FarmType)	0.023	0.011	0.0001	N.S.	N.S.
	P(FarmType*Season)	< 0.0001	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
	P(Season*LactStage)	0.002	N.S.	N.S.	N.S.	0.0004
Main effects	P(LactStage)	-	-	-	< 0.0001	-
	P(FarmType)	-	-	-	0.03	N.S.
	P(Season)	-	N.S.	N.S.	< 0.0001	-
	P(bCSupp)	N.S.	N.S.	0.03	N.S.	N.S.
	P(VitSupp)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0006	0.001
	P(Parity)	0.04	0.01	N.S.	0.02	0.02
	P(CI)	N.S.	N.S.	N.S.	0.01	N.S.

bC = β -carotene; VitE = Vitamin E; GPx = glutathione peroxidase; NEFA = non-esterified fatty acids, BHB = β -hydroxybutyrate; FarmType = type of farm (zero-grazing or grazing farm); LactStage = lactation stage (dry cows, early in lactation or in mid lactation); Season (autumn, winter or summer); bCSupp = β -carotene supplementation (presence of bC supplement of any kind in the ration); VitSupp = Vitamin supplementation (presence of vitamin supplement of any kind in the ration, including bC); CI = calving interval.

Table 3. Mean plasma β -carotene concentrations (\pm SEM, $\mu\text{g}/\text{mL}$) split according to FarmType, Season and LactStage. Based on the significant pairwise interactions between lactation stage (LactStage), type of farm (FarmType) and Season in the linear mixed model with β -carotene (bC) as outcome (LactStage*FarmType, FarmType*Season and Season*LactStage; cf Table 2), mean plasma bC \pm SEM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) is split according to the interacting variables and the effect of the other interacting variable (last column) is reported. The mean plasma bC concentrations and the main effects of LactStage are shown within each Season and FarmType; mean bC and the main effects of FarmType are shown within each Season and LactStage, and mean bC and the main effects of Season are shown within each LactStage and FarmType.

FarmType	Season	LactStage		
Grazing (2.90 ± 0.09)	AUT (3.63 ± 0.17) WIN (2.53 ± 0.12) SUM (2.37 ± 0.14)	DRY	EARLY LACT	MID LACT
		4.40 ± 0.28^a	2.48 ± 0.19^b	4.04 ± 0.32^a
		2.28 ± 0.16^a	2.04 ± 0.20^a	3.22 ± 0.21^b
Zero-grazing (2.54 ± 0.07)	AUT (2.60 ± 0.15) WIN (2.74 ± 0.15) SUM (2.31 ± 0.08)	2.73 ± 0.21^a	1.73 ± 0.09^b	2.69 ± 0.30^a
		2.05 ± 0.18^a	2.04 ± 0.16^a	3.70 ± 0.32^b
		2.21 ± 0.20^a	2.36 ± 0.19^a	3.64 ± 0.28^b
		2.19 ± 0.12^a	1.83 ± 0.11^a	2.96 ± 0.15^b
LactStage	Season	FarmType		
DRY (2.62 ± 0.10)	AUT (3.21 ± 0.22) WIN (2.24 ± 0.13) SUM (2.37 ± 0.11)	Grazing	Zero-Grazing	
		4.40 ± 0.28^a	2.05 ± 0.18^b	
		2.28 ± 0.16^a	2.21 ± 0.20^a	
EARLY LACT (2.09 ± 0.07)	AUT (2.26 ± 0.12) WIN (2.20 ± 0.14) SUM (1.79 ± 0.08)	2.73 ± 0.21^a	2.19 ± 0.12^b	
		2.48 ± 0.19^a	2.04 ± 0.16^a	
		2.04 ± 0.20^a	2.36 ± 0.19^a	
MID LACT (3.40 ± 0.11)	AUT (3.87 ± 0.23) WIN (3.43 ± 0.18) SUM (2.85 ± 0.15)	1.73 ± 0.09^a	1.83 ± 0.11^a	
		4.04 ± 0.32^a	3.70 ± 0.32^a	
		3.22 ± 0.21^a	3.64 ± 0.28^a	
		2.69 ± 0.30^a	2.96 ± 0.15^a	
FarmType	LactStage	Season		
Grazing (2.90 ± 0.09)	DRY (3.23 ± 0.17) EARLY LACT (2.12 ± 0.11) MID LACT (3.37 ± 0.17)	AUT	WIN	SUM
		4.40 ± 0.28^a	2.28 ± 0.16^b	2.73 ± 0.21^b
		2.48 ± 0.19^a	2.04 ± 0.20^{ab}	1.73 ± 0.09^b
Zero-grazing (2.54 ± 0.07)	DRY (2.15 ± 0.09) EARLY LACT (2.06 ± 0.09) MID LACT (3.41 ± 0.15)	4.04 ± 0.32^a	3.22 ± 0.21^{ab}	2.69 ± 0.30^b
		2.05 ± 0.18^a	2.21 ± 0.20^a	2.19 ± 0.12^a
		2.04 ± 0.16^a	2.36 ± 0.19^a	1.83 ± 0.11^a
		3.70 ± 0.32^a	3.64 ± 0.28^a	2.96 ± 0.15^a

DRY = dry period; EARLY LACT = early lactation; MID LACT = mid lactation; WIN = winter; AUT = autumn; SUM = summer; SEM = standard error of the mean. ^{ab} Data marked with different letters in the same row differ significantly.

nents of the ration can vary significantly under field conditions, as they rely on the appetite of the cow, availability and reachability of food at the feed bunk, competition between animals, etc. Furthermore, the AO content of roughages may vary in time as well, influenced by conservation time, UV (season), pH and others (Ballet et al., 2000). In accordance to LeBlanc et al. (2004), the authors did not study the effects of detailed dietary components and/or exact feed intake in a large multi-herd case study. The specific aim was to broadly screen the average circulating bC and VitE concentrations as a measure of the antioxidative status of grazing (fresh grass in diet) and zero-grazing (no fresh grass in diet) dairy farms. However, next to the presence of fresh grass in grazing farms (pasture or freshly cut grass, regardless of the proportion of this fresh grass in the total ration), the following objectively measurable dietary factors under field conditions were taken into account: 1) whether the cows housed in grazing farms were grazing or had access to fresh grass at the specific moment of blood sampling, 2) whether the farmer added vitamin supplements of any kind in the diet (regardless of the amount) (Yes/No) and 3) whether the farmer added bC supplements to the diet (regardless of the amount) (Yes/No).

Analysis of blood parameters

Inter-assay coefficients of variation (CV) are indicated between brackets. Plasma bC was photometrically analyzed with the iCheck™ (BioAnalyt GmbH, Germany) (2.3 %) according to Schweigert et al. (2007). Serum VitE (9.5 %) was analyzed by means of liquid-liquid extraction and HPLC with UV detection at 292 nm (1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Carla, USA). To estimate the metabolic impact of the negative energy balance in the cows, NEFA (5 %) and BHB (3.5 %) were colorimetrically and enzymatically determined (Randox Laboratories, CrumLin, United Kingdom) in serum with a Gallery™ Plus Automated Photometric Analyzer with detection at 550 nm and 340 nm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), respectively. In addition to bC and VitE, plasma concentrations of glutathione peroxidase (GPx; 1.8 % intra-assay, 6.8 % inter-assay CV) were routinely analyzed as a measure of the AO status according to Paglia and Valentine (1967) by means of a commercially available GPx kit (Randox Laboratories, Germany) and were spectrophotometrically detected (Cobas 8000, Rotkreuz, Switzerland).

iCheck β-carotene analysis and evaluation of the antioxidant status of dairy cows

A portable spectrophotometer (iCheck™, Bioanalyt, Germany) was used to assess the blood bC concentrations of each cow. This method was evaluated under field conditions by analyzing identical samples on blood bC with: 1) the portable ‘on farm’ iCheck™

method (612 cows), 2) a laboratory chromatographic method (liquid-liquid extraction and HPLC with UV-VIS detection at 450 nm, 6.1 % CV, Surveyor LC Pump Plus, Autosampler Plus and PDA Detector, Thermo Fisher Scientific, Belgium) (54 cows) and 3) a laboratory spectrophotometric method (with UV detection at 450 nm, 4.5 % CV, DR3900, Hach Lange, Berlin, Germany) (612 cows). Additionally, blood was also sampled from the tail vein from the same cows (40 cows) in order to evaluate whether the source of blood (udder versus tail vein) influences the iCheck™ bC analysis.

The most recent reference values on optimal serum bC (< 1.5 µg/mL = deficient, 1.5 – 3.5 µg/mL = suboptimal, > 3.5 µg/mL = optimal; Schweigert and Immig, 2007) and VitE concentrations (< 3 µg/mL = deficient, ≥ 3 µg/mL = sufficient; Baldi, 2005) in dairy cows reported in the literature and applied in practice (Calsamiglia and Rodriguez, 2012) were used as benchmark to interpret the antioxidative status of the sampled cows as being optimal, suboptimal or deficient.

Statistical methods

The influence of lactation stage, season and farm type on bC, VitE, GPx, logNEFA, and logBHB (hereafter referred to as ‘the outcomes’) was modeled using linear mixed models. For each of the five outcomes, the linear mixed model was built using a stepwise backward approach, starting from a full model including lactation stage, season, farm type and their pairwise interactions. In addition, the main effects of parity, bC supplementation, vitamin supplementation and CI were included in the initial model. To account for the dependence between observations in the same cow (random sampling of identical cows occurred occasionally) and for observations within the same farm, a random intercept for cow and farm was included plus random slopes for season and lactation stage. In case of a significant pairwise interaction, the data were split according to one of the interacting variables and the effect of the other interacting variable was reported in the separate groups. If the pairwise interaction was non-significant, the interaction term was removed from the model and the significance of the main effects was tested using the F-test with Kenward-Roger correction for the number of degrees of freedom.

Body condition scores were compared between lactation stages and the annual milk yield per cow of each farm was compared between grazing and zero-grazing farms using a mixed model and one-way ANOVA, respectively. Pairwise correlation between iCheck™ bC and laboratory analyzed bC values or VitE concentrations were expressed using the Pearson correlation coefficient. Plasma bC sampled from the udder vein was compared with plasma bC withdrawn from the tail vein using one-way ANOVA. A log trans-

Table 4. Mean plasma vitamin E concentrations (\pm SEM, $\mu\text{g/mL}$) split according to FarmType and LactStage. Based on the significant pairwise interaction between lactation stage (LactStage) and type of farm (FarmType) in the linear mixed model with vitamin E (VitE) as outcome (LactStage*FarmType; cf Table 2), mean plasma VitE \pm SEM ($\mu\text{g/mL}$) is split according to the interacting variables and the effect of the other interacting variable (last column) is reported. The mean plasma VitE concentrations and the main effects of LactStage are shown within each FarmType; mean VitE and the main effects of FarmType are shown within each LactStage.

FarmType	LactStage		
	DRY	EARLY LACT	MID LACT
Grazing (4.10 ± 0.10)	4.50 ± 0.20^a	2.90 ± 0.20^b	5.00 ± 0.20^a
Zero-grazing (3.90 ± 0.10)	3.40 ± 0.10^a	3.00 ± 0.10^a	5.30 ± 0.20^b
LactStage	FarmType		
	Grazing	Zero-grazing	
DRY (3.90 ± 0.10)	4.50 ± 0.20^a	3.40 ± 0.10^b	
EARLY LACT (3.00 ± 0.10)	2.90 ± 0.20^a	3.00 ± 0.10^a	
MID LACT (5.20 ± 0.10)	5.00 ± 0.20^a	5.30 ± 0.20^a	

DRY = dry period; EARLY LACT = early lactation; MID LACT = mid lactation; SEM = standard error of the mean. ^{ab} Data marked with different letters in the same row differ significantly.

Table 5. Mean red blood cell glutathione peroxidase concentrations (\pm SEM, U/gHb) split according to FarmType and LactStage. Based on the significant pairwise interaction between lactation stage (LactStage) and type of farm (FarmType) in the linear mixed model with glutathione peroxidase (GPx) as outcome (LactStage*FarmType; cf Table 2), mean red blood cell GPx \pm SEM (U/gHb) is split according to the interacting variables and the effect of the other interacting variable (last column) was reported. The mean plasma GPx concentrations and the main effects of LactStage are shown within each FarmType; mean GPx and the main effects of FarmType are shown within each LactStage.

FarmType	LactStage		
	DRY	EARLY LACT	MID LACT
Grazing (510.90 ± 12.20)	556.70 ± 25.00^a	471.40 ± 19.20^b	509.40 ± 18.70^b
Zero-grazing (499.90 ± 10.40)	480.90 ± 18.80^a	488.5 ± 16.50^a	530.40 ± 19.20^b
LactStage	FarmType		
	Grazing	Zero-grazing	
DRY (512.40 ± 15.30)	556.70 ± 25.00^a	480.90 ± 18.80^a	
EARLY LACT (480.90 ± 12.50)	471.40 ± 19.20^a	488.50 ± 16.50^a	
MID LACT (521.1 ± 13.5)	509.40 ± 18.70^a	530.40 ± 19.20^a	

DRY = dry period; EARLY LACT = early lactation; MID LACT = mid lactation; SEM = standard error of the mean. ^{ab} Data marked with different letters in the same row differ significantly.

Table 6. Mean plasma non-esterified fatty acid concentrations (\pm SEM, mM) in each LactStage, FarmType and Season. Based on the non-significant pairwise interactions between lactation stage (LactStage), type of farm (FarmType) and Season in the linear mixed model with non-esterified fatty acids (NEFAs) as outcome (LactStage*FarmType, FarmType*Season and Season*LactStage; cf Table 2), mean serum NEFA \pm SEM (mM) and the main effects of LactStage, FarmType and Season are presented.

LactStage		
	EARLY LACT	MID LACT
DRY 0.24 ± 0.02^a	0.36 ± 0.02^b	0.14 ± 0.01^c
FarmType		
	Zero-grazing	
Grazing 0.24 ± 0.02^a	0.25 ± 0.01^b	
Season		
	WIN	SUM
AUT 0.18 ± 0.02^a	0.22 ± 0.02^a	0.34 ± 0.02^b

DRY = dry period; EARLY LACT = early lactation; MID LACT = mid lactation; WIN = winter; AUT = autumn; SUM = summer; SEM = standard error of the mean. ^{abc} Data marked with different letters in the same row differ significantly.

Table 7. Mean plasma β -hydroxybutyrate concentrations (\pm SEM, mM) split according to Season and LactStage. Based on the significant pairwise interaction between lactation stage (LactStage) and Season in the linear mixed model with β -hydroxybutyrate (BHB) as outcome (Season*LactStage; see Table 2), mean serum BHB \pm SEM (mM) is split according to the interacting variables and the effect of the other interacting variable (last column) was reported. The mean serum BHB concentrations and the main effects of LactStage are shown within each season, and mean serum BHB concentrations and the main effects of season are shown within each LactStage.

Season	LactStage		
	DRY	EARLY LACT	MID LACT
AUT (0.68 \pm 0.04)	0.80 \pm 0.10 ^a	0.63 \pm 0.04 ^a	0.61 \pm 0.06 ^a
WIN (0.70 \pm 0.04)	0.66 \pm 0.05 ^{ab}	0.91 \pm 0.09 ^a	0.52 \pm 0.03 ^b
SUM (0.80 \pm 0.05)	0.74 \pm 0.06 ^{ab}	1.10 \pm 0.13 ^a	0.59 \pm 0.03 ^b
LactStage	Season		
	AUT	WIN	SUM
DRY (0.73 \pm 0.04)	0.80 \pm 0.10 ^a	0.66 \pm 0.05 ^a	0.74 \pm 0.06 ^a
EARLY LACT (0.88 \pm 0.05)	0.63 \pm 0.04 ^a	0.91 \pm 0.09 ^{ab}	1.10 \pm 0.13 ^b
MID LACT (0.57 \pm 0.02)	0.61 \pm 0.06 ^a	0.52 \pm 0.03 ^a	0.59 \pm 0.03 ^a

WIN = winter; AUT = autumn; SUM = summer; DRY = dry period; EARLY LACT = early lactation; MID LACT = mid lactation; SEM = standard error of the mean. ^{ab}Data marked with different letters in the same row differ significantly.

Table 8. Details of cows in each lactation stage. The total number of cows in each lactation stage (LactStage) is presented as well as the mean days post-partum, mean parity and mean body condition score (BCS).

Item	LactStage		
	DRY	EARLY LACT	MID LACT
Total number of cows	198	206	208
Mean days post-partum	392.4 \pm 6.5	17.8 \pm 0.9	79.8 \pm 2.2
Mean parity	2.3 \pm 0.1	3.0 \pm 0.1	2.7 \pm 0.1
Mean BCS	3.27 \pm 0.04 ^a	2.75 \pm 0.04 ^b	2.57 \pm 0.03 ^c

Statistics were only performed on BCS. ^{abc}Data marked with different letters in the same row differ significantly.

formation was applied to correct for abnormality and inhomogeneity of variances when necessary. All data were presented as means \pm SEM. Analyses were carried out in IBM SPSS Statistics 23 for Windows (Chicago, IL, USA) or in R 3.2.1 (R Core Team, 2014). The threshold for statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

The original data of this study are available at Mendeley Data (<http://dx.doi.org/10.17632/vzn5s-5mty.1>).

To model the effect of lactation stage, season and farm type on bC, VitE, GPx, logNEFA, and logBHB, linear mixed models were fitted. The significant terms from these models for each outcome parameter are shown in Table 2. Means \pm SEM are shown in Tables 3 to 7 including the main effects of interacting variables, taking into account the other interacting variables. Effect sizes accounting for significant effects of parity, bC supplementation, vitamin supplementation and CI are described below.

Animals

A total of 630 cows from fourteen farms situated in Flanders were sampled, of which 612 samples were successfully analyzed. The total number of sampled cows in each lactation stage (DRY, EARLY LACT and MID LACT) as well as mean days post-partum, parity and BCS are presented in Table 8. The body condition scores were significantly different with the lowest scores in MID LACT and the highest scores in DRY cows ($P < 0.01$). The dairy farms included in this study counted a mean of 106 \pm 12 cows (84 \pm 7 in grazing farms, 128 \pm 19 in zero-grazing farms) and had an average annual milk yield per cow of 9,280 \pm 188 kg. The mean annual milk yield per cow on each farm did not significantly differ between grazing (9,166 \pm 256 kg) and zero-grazing farms (9,394 \pm 290 kg) and was therefore not further taken into account in the final statistical model.

β -carotene

The final model for bC included significant interactions between lactation stage (LactStage), type of

farm (FarmType) and season, as well as significant main effects for vitamin supplementation (VitSupp) and parity (cf Table 2 for exact P-values). Since there are no main effects of LactStage, FarmType and Season on plasma bC, the effect of LactStage is separately reported by Season and FarmType in Table 3. In each FarmType and season, EARLY LACT was associated with a significantly lower plasma bC compared with MID LACT. In grazing farms in AUT and SUM, the DRY period was associated with significant higher bC concentrations in cows than in EARLY LACT cows, which was not the case in cows from zero-grazing farms. Similarly, when focusing on the effect of FarmType in each Season and LactStage (Table 3), only in DRY cows in AUT and SUM, bC concentrations were significantly higher in cows from grazing farms than in cows from zero-grazing farms. Additionally, when focusing on the effect of Season in each LactStage and FarmType (Table 3), bC concentrations in cows from grazing farms were significantly lower in SUM than in AUT. Interestingly, this reduction in circulating bC during SUM was not present in cows housed under zero-grazing conditions.

VitSupp (but not bCSupp) was associated with increased plasma bC in DRY cows from grazing farms in all seasons ($+1.25 \pm 0.28 \mu\text{g/mL bC}$). In contrast, VitSupp in MID LACT was significantly linked to reduced plasma bC concentrations ($-1.27 \pm 0.49 \mu\text{g/mL bC}$ in grazing farms and $-1.04 \pm 0.49 \mu\text{g/mL bC}$ in zero-grazing farms). Also parity was a factor associated with plasma bC, with a slightly reduced plasma bC concentration with increased parity (-0.11 ± 0.05 to $-0.31 \pm 0.10 \mu\text{g/mL bC}$ depending on FarmType, LactStage and season).

Vitamin E

Whereas season did not alter VitE concentrations, LactStage and FarmType significantly interacted and influenced plasma VitE concentrations (cf Table 2 for exact P-values). Similarly to bC, VitSupp and Parity significantly altered plasma VitE concentrations and were included as a dependent variable in the final model with VitE as outcome. The main effects of LactStage and FarmType on plasma VitE could not be calculated separately and thus the effect of LactStage in each FarmType was investigated and is shown in Table 4. The effects of LactStage and FarmType on VitE concentrations were similar to the effects observed on circulating bC. VitE concentrations were significantly lower in EARLY LACT than in MID LACT cows in both types of farms. In grazing farms, DRY cows had significant higher plasma VitE than EARLY LACT cows. Similarly, when focusing on the effect of FarmType in each LactStage (Table 4), VitE concentrations were significantly higher in DRY cows in grazing farms than in zero-grazing farms.

VitSupp (but not bCSupp) was associated with increased plasma VitE concentrations in both farm types, but only in DRY cows ($+1.00 \pm 0.28 \mu\text{g/mL}$

VitE). Increasing parity was linked to reduced plasma VitE concentrations ($-0.18 \pm 0.06 \mu\text{g/mL VitE}$), but only in cows on grazing farms.

Glutathione peroxidase

LactStage and FarmType significantly interacted and affected plasma GPx concentrations (cf Table 2 for exact P-values). Season did not influence plasma GPx concentrations. VitSupp and bCSupp but not Parity significantly altered plasma GPx concentrations as well, and were included as a dependent variable in the final model with GPx as outcome. The main effects of LactStage and FarmType on plasma GPx could not be calculated separately and thus the effect of LactStage in each FarmType was investigated (Table 5). Only in cows from zero-grazing farms, GPx concentrations were significantly lower in EARLY LACT than in MID LACT. DRY cows from grazing farms had significantly higher plasma GPx concentrations than MID LACT cows and EARLY LACT cows. Regardless of these findings, no significant impact of type of farm was found (Table 5).

VitSupp and bCSupp were significantly associated with reduced plasma GPx concentrations, but only in cows from grazing farms ($-80.76 \pm 27.29 \text{ U/gHb GPx}$ when supplemented with vitamins and $-159.02 \pm 46.36 \text{ U/gHb GPx}$ when supplemented with bC).

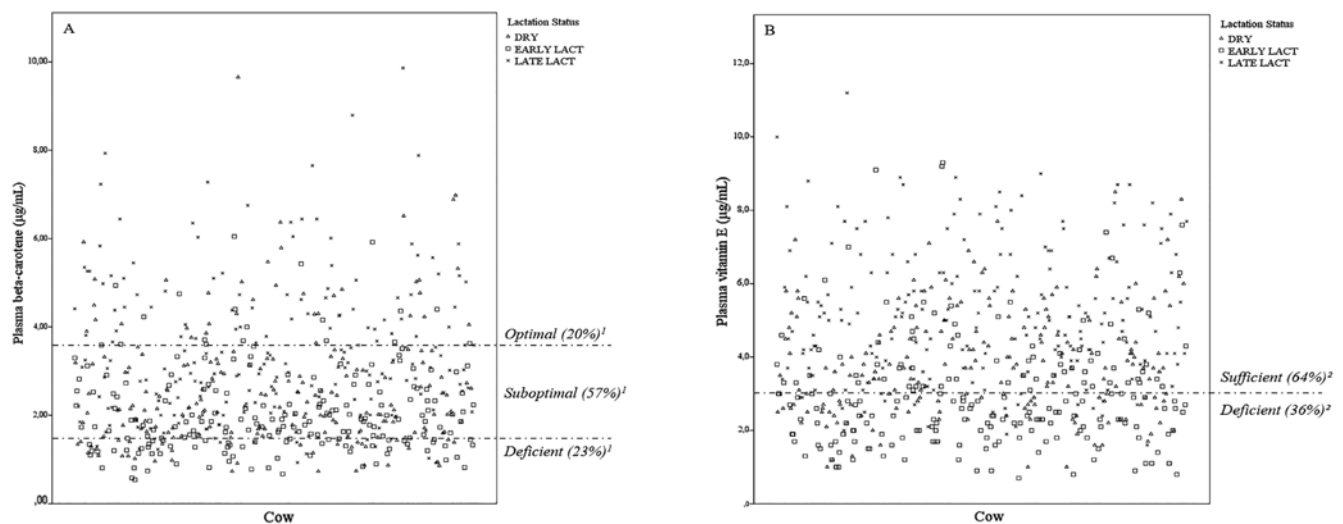
Blood parameters for energy balance

Non-esterified fatty acids

Plasma NEFA concentrations were heavily skewed and subsequently log-transformed in the final model. None of the three main factors (LactStage, FarmType and Season) significantly interacted for logNEFA concentrations, but they all had a significant main effect on plasma logNEFA concentrations (cf Table 2 for exact P-values). VitSupp, parity and CI were significantly linked to plasma logNEFA and are included as a dependent variable in the final model with logNEFA as outcome. Mean NEFA concentrations \pm SEM in each group of interest are shown in Table 6. Circulating NEFAs were significantly higher in EARLY LACT cows than in DRY and MID LACT cows (Table 6). Plasma NEFA concentrations were significantly, but only 0.01 mM higher in cows from zero-grazing farms than in cows from grazing farms (Table 6). Plasma NEFA were significantly higher during SUM than during AUT and WIN (Table 6). VitSupp was linked to reduced plasma NEFA concentrations ($-0.04 \pm 0.06 \text{ mM NEFA}$), whereas increasing parity and CI were associated with increased circulating NEFAs ($+0.03 \pm 0.01$ and $+0.01 \pm 0.00 \text{ mM NEFA}$, respectively).

B-hydroxybutyrate

Plasma BHB concentrations were heavily skewed



Figures 2A. Beta-carotene and 2B. vitamin E statuses of dairy cows under field conditions. Beta-carotene (analyzed by means of the iCheck™) and vitamin E values of each individual cow are presented according to lactation stage (DRY = dry cows, 2 to 4 weeks before calving; EARLY LACT = early lactation cows from 0 to 3 weeks after calving; MID LACT = mid lactation cows at the moment of artificial insemination). ¹Reference values for beta-carotene are based on Schweigert and Immig (2007): < 1.5 µg/mL = deficient, 1.5 – 3.5 µg/mL = suboptimal, > 3.5 µg/mL = optimal. ²Reference values for vitamin E are based on Baldi (2005): < 3 µg/mL = deficient, > 3 µg/mL = sufficient. Percentages of cows in each category are indicated between brackets.

and subsequently log-transformed in the final model. Season and LactStage significantly interacted and affected plasma logBHB concentrations (cf Table 2 for exact P-values). FarmType did not influence plasma logBHB concentrations. VitSupp and parity were significantly associated with plasma logBHB concentrations and were included as a dependent variable in the final model with logBHB as outcome. Mean BHB concentrations \pm SEM dependent on LactStage and Season are shown in Table 7. Only in WIN and SUM, EARLY LACT cows had significantly higher plasma BHB concentrations than MID LACT cows. In EARLY LACT cows, BHB concentrations were significantly increased in SUM than in AUT. Regardless of a significant main effect of VitSupp and Parity on BHB concentrations (Table 2), no differences were found in plasma BHB in cows due to VitSupp or Parity.

iCheck β -carotene analysis and the antioxidant status of dairy cows

The iCheck™ bC concentrations measured under field conditions ($n = 612$) correlated significantly with the spectrophotometric bC concentrations ($n = 612$) ($R = 0.798$) and the chromatographic bC concentrations ($n = 54$) ($R = 0.769$) measured under laboratory conditions. β -carotene in blood sampled from the udder vein (3.55 ± 0.24 µg/mL, $n = 40$) was similar to blood bC concentrations withdrawn from the tail vein (3.63 ± 0.25 µg/mL, $n = 40$). ICheck bC also correlated significantly with VitE concentrations ($R = 0.668$). The results of the bC and VitE statuses of Flemish dairy cows are presented in Figures 2 a and 2b. When bC reference values were applied, 20 % of the sam-

pled cows had an optimal bC level of > 3.5 µg/mL, whereas 23 % of the cows had deficient bC concentrations < 1.5 µg/mL. The majority of cows had suboptimal levels of bC (between 1.5 and 3.5 µg/mL). In case of VitE, 64 % of the cows had sufficient levels of VitE (≥ 3 µg/mL), but 36 % of the sampled cows showed deficient circulating VitE concentrations (< 3 µg/mL). Notably, the majority of cows with deficient bC and VitE levels were EARLY LACT cows (54 % for bC and 59 % for VitE), while DRY cows accounted for 34 % (bC) and 30 % (VitE) and MID LACT cows for 12 % (bC) and 11 % (VitE). In total, 77 % of the cows deficient in bC and 59 % of the cows with deficient VitE levels were cows from zero-grazing farms.

DISCUSSION

β -carotene and VitE have been proposed as important antioxidants in metabolically stressed dairy cows, as their serum concentrations are indicative for their antioxidative status and linked to health and fertility outcomes (Jukola et al., 1996; Ayasan and Karakozak, 2010; Nayyar and Jindal, 2010). However, knowledge of the actual bC and VitE statuses in dairy cows as well as the interrelationship of factors influencing that antioxidant status is currently lacking. In this study, the authors aimed to investigate the antioxidant status (focusing on bC and VitE) in dairy farms in Flanders taking into account factors, such as lactation stage of the cow, type of farm (grazing or zero-grazing) and season. In the study, it was shown that these factors were associated with the levels of plasma bC and VitE and red blood cell GPx and that they were interrelated. One third of the dairy cows sampled in this study

had deficient circulating bC and VitE concentrations. It could be confirmed that especially the early post-partum period is the most critical one in terms of circulating bC, VitE and GPx, coinciding with the NEB status.

Plasma bC and VitE levels reached their nadir early post-partum, whereas serum NEFA and BHB were highest during this period, indicative for a metabolic status of NEB (Drackley et al., 2001). This reduction in bC and VitE concentrations peri-partum has been reported previously (Calderon et al., 2007; Sharma et al., 2011) and can be attributed to: 1) the reduced dry matter intake post-partum (Grummer et al., 2004; Calderon et al., 2007) resulting in less antioxidant uptake from the ration, 2) the increased use of antioxidants during this NEB state since cows suffer from elevated OS early post-partum (Bernabucci et al., 2002) or 3) the massive increased milk production and loss of fat soluble antioxidants via colostrum and milk (Calderon et al., 2007; Kankofer and Albera, 2008).

The type of farm is associated with altered plasma bC and VitE concentrations in dry cows only. This implies that fresh grass-based diets high in bC and VitE can increase plasma bC and VitE levels in dry cows, as shown by Calderon et al. (2007). However, dry cows at grazing farms are often kept on fields with low quality pasture to avoid high calcium and potassium intakes pre-partum. As such, the observed higher bC and VitE levels in dry cows from grazing-farms may be explained by the release of bC and VitE reserves from fat depots when needed, which will not be excreted in dry cows via milk. This accumulation in lipid stores most probably takes place during the last phase of lactation when cows are in positive energy balance and still grazing on pasture (Baldi, 2005; Noziere et al., 2006). Similar to the observed increase in AO in dry cows under grazing conditions, the authors previously showed that bC supplementation exceeding daily recommendations (>300 – 1.000 mg bC per head per day (Calsamiglia and Rodriguez, 2012), but matching the amount of bC intake at grazing (2.000 mg bC; Kawashima et al., 2010) in non-lactating (dry, but not pregnant) cows, could increase circulating bC levels (De Bie et al., 2016). Moreover, this interventional study also showed that daily bC supplementation was associated with increased bC levels in NEB cows as well (De Bie et al., 2016). In the present field study, grazing could not be linked with increased bC levels in NEB cows in early lactation. In accordance, Johansson et al. (2014) showed that cows in organic dairy farms, receiving fresh grass and legume silages, could fulfill their VitE and VitA (metabolite of bC) requirements without supplementation, except at the time around peak lactation. These observations further emphasize the impact of the three factors described above (reduced DMI and thus AO uptake, increased OS, increased loss of AO via milk) on the cow's AO status early post-partum, explaining the absence of any effect of fresh grass in the diet on

bC levels in lactating cows.

Season was significantly associated with altered plasma bC concentrations, but only in cows from grazing farms. Unexpectedly, bC levels in cows from grazing farms were not highest during SUM when all cows were grazing, but in AUT when 52% of the cows had already been stalled and temperature had cooled down. In four out of five grazing farms in SUM, blood was collected at a moment when the THI reached a mean of 79 ± 4 , indicating moderate stress due to heat (Armstrong, 1994). Heat stress may be responsible for the reduced circulating bC concentrations observed in SUM (Quintela et al., 2008). In addition, fresh grass contains high concentrations of bC, which is sensitive to breakdown by UV, lowering the bC uptake from the ration and thus resulting in reduced circulating bC in SUM (Ballet et al., 2000). In zero-grazing farms, no effect of season on circulating bC concentrations could be observed. This may be attributed to the presence of shade in the stables, which is known to reduce heat stress (Armstrong, 1994), or to the fact that no fresh grass was present in the ration of cows housed in zero-grazing farms that is vulnerable to breakdown by UV.

Next to dietary antioxidants, GPx (present in e.g. erythrocytes) is an important intracellular enzyme, which represents a major antioxidant defence mechanism in the body (Cohen and Hochstein, 1963). In the present study, a decline in red blood cell GPx was observed during early lactation, which is consistent with other reports (Festila et al., 2013; Konvičná et al., 2015). The highest GPx concentrations were observed in dry cows from grazing farms. It can be assumed that the availability of fresh grass during or prior to the dry period can increase the capacity of defence mechanisms against OS, which can be emphasized by the earlier described high bC and VitE levels in dry cows from grazing farms. As such, the type of ration prior to or during the dry period seems to be of high importance for the circulating bC, VitE and GPx levels of dry cows in particular. In this regard, most recent supplementation guidelines recommend higher supplementation of bC and VitE in cows during the dry and early lactation period than in late post-partum cows (Calsamiglia and Rodríguez, 2012).

As described above, bC and VitE levels in dairy cows vary according to lactation stage, farm type and season, but type of forage or nutritional vitamin uptake is the predominant factor affecting circulating bC and VitE (Noziere et al., 2006). As such, the influence of vitamin and bC supplements was taken into account in this study. Increased plasma bC and VitE levels were detected when the farmer indicated that extra vitamins were supplemented in the ration, but only in dry cows. Surprisingly and in contrast, vitamin and/or bC supplementation in mid lactating cows was associated with reduced plasma bC and reduced red blood cell GPx concentrations. Caution needs to be taken when interpreting these results, especially

because farmers with herd problems may supplement their cows more easily in order to improve dairy cow health, transition, production and/or reproduction. As such, the factor 'vitamin or bC supplementation' may be associated with reduced circulating AO as a result of health problems during the transition period that are associated with increased oxidative stress and thus reduced circulating AO.

In search for the bC status of cows, an easy applicable cow side test (iCheck™) was used. This portable spectrophotometer allows direct on-farm analysis of whole blood samples from the tail vein within five minutes. Schweigert and Immig (2007) have validated this cow side bC test under controlled experimental conditions and showed high correlations between iCheck bC and bC analyzed by means of HPLC ($R=0.990$). For the first time, this bC test has been used under variable field conditions and showed good correlations with bC analyzed by HPLC ($R=0.798$). In this way, the dairy farmer and the veterinarian are provided with a highly efficient analyzing strategy to rapidly screen the bC status of its herd (Schweigert and Immig, 2007). Moreover, thanks to the correlation between iCheck bC and VitE, the VitE status can also be estimated based on the iCheck bC levels. These blood bC and VitE concentrations contribute to the AO defence system (Sies, 1993), which provides an indication of the AO status of cows within a farm. Results of this screening in the present study showed that about one fourth of all cows were deficient in circulating bC levels while one third of the cows had deficient VitE levels. Not surprisingly, the majority of the cows deficient in bC and VitE were cows in early lactation and on zero-grazing farms. Nevertheless, still a significant number of cows on grazing farms (\pm one third) had deficient bC and VitE concentrations. As previously discussed, it is clear that the early lactation stage, in which cows suffer from a NEB period is responsible for these deficiencies in bC and VitE both on grazing as well as on zero-grazing farms. Focusing on reproduction, this NEB induced reduction in AO levels is reflected in the oocyte's micro-environment or follicular fluid. Strategically supplied bC can improve antioxidant concentrations in the follicular fluid regardless of the energy state of the cow, which provides opportunities for improvement of fertility (De Bie et al., 2016). However, that study was performed in a non-lactating dietary induced NEB cow model. Integrating this with the data of the present study, it can be concluded that optimizing the AO status in early lactating dairy cows may be a challenge. Nowadays, commercially established vitamin requirements have substantially increased (Calsamiglia and Rodríguez, 2012), with an obvious need for increases in daily bC and VitE supplementations per head. Despite the existence of these commercial advices and the awareness of the importance of optimal vitamin nutrition by dairy farmers (reflected by the fact that 71% of the Flemish dairy farms in this study supplemented

their cows with vitamins of any kind), still 25 to 35% of the Flemish dairy cows have deficient bC and VitE levels. Possibly, the lack of knowledge on the factors influencing these circulating antioxidants and thus the ignorance of when to supplement and which cows to supplement might be responsible for the deficiencies observed in the dairy industry. Moreover, in 2001, the NRC concluded that there was insufficient knowledge on the bC action in dairy cattle and the factors influencing its presence to be able to formulate any official requirements for dairy cows (NRC, 2001). The knowledge generated in the present study may help to formulate new bC and VitE recommendations, since it is clear that there is a need for the optimization of antioxidant nutritional management in the dairy industry, especially in early lactating cows and cows from zero-grazing farms.

The farms included in this case study are representative for the average dairy farm in Flanders based on average milk yield and mean number of cows per farm. Models predict that the number of grazing farms in North-West Europe will keep on declining from two thirds of the cows currently grazing to only one third grazing in 2025 (Reijs et al., 2013). These results possibly also apply to the Southern part of Belgium and other countries throughout Europe and beyond which have a similar climate and follow the same trend of a reduced number of grazing farms and an increased use of silages. This furthermore emphasizes the growing importance of the optimization of AO nutrition in the dairy industry in general. The authors believe that the conclusions drawn in this study are interesting for and may be applicable to dairy farms in Western Europe managed in similar climate and feeding conditions as seen in the cohort of the current study.

CONCLUSION

The dataset revealed that the factors influencing circulating bC and VitE are all interrelated and mainly depend on the metabolic state of the cow and management practices of the farmer: lactation stage of the cow, farm type (grazing and zero-grazing farms), season, extra vitamin supplementation and parity. The presence of fresh grass in the ration could not prevent the NEB induced decline in circulating bC, VitE and GPx, but it seems that dry cows in particular benefit most from being housed on a grazing farm. Finally, at least one third of dairy cows was shown to have deficient circulating bC and VitE concentrations, especially cows in early lactation and cows housed under zero-grazing conditions. The easily applicable cow side bC test (iCheck™) is used under field conditions and is ideal to easily assess a cow's bC status. In this study, it is emphasized that more attention on antioxidant nutrition in the dairy industry is required, which would provide an important opportunity for improvement of health and fertility of the modern high yield-

ing dairy cow kept under rapidly evolving management conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by Veepeiler Rund (DGZ, Drongen, Belgium) and the Flemish Research Fund (FWO grant, G019214N). The authors greatly acknowledge DSM Nutritional Products (Kaiseraugst, Switzerland) for providing the iCheck™ spectrophotometer to perform all on-farm β -carotene analysis. Thanks to the laboratory of DGZ and the Algemeen Medisch Laboratorium (AML, Antwerp, Belgium) for all blood analyses. The authors also gratefully thank all participating dairy farms.

REFERENCES

- [Dataset] De Bie, J., Proost, K., Van Loo, H., Callens, J., Bols, P.E.J., Fransen, E., Leroy, J.L.M.R., Dataset b-carotene and VitE status in dairy cows, Mendeley Data, v1, 2018, <http://dx.doi.org/10.17632/vzn5s5mtty.1>.
- Abuelo, A., Hernández, J., Benedito, J.L., Castillo, C., (2015). The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99, 1003-1016.
- Adewuyi, A., Gruys, E., Van Eerdenburg, F., (2005). Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary Quarterly* 27, 117-126.
- Armstrong, D.V., (1994). Heat stress interaction with shade and cooling. *Journal of Dairy Science* 77, 2044-2050.
- Ayasan, T., Karakozak, E., (2010). Use of beta-carotene in animal nutrition and its effects. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 16, 697-705.
- Baldi, A., (2005). Vitamin E in dairy cows. *Livestock Production Science* 98, 117-122.
- Ballet, N., Robert, J., Williams, P., (2000). 19 Vitamins in forages. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*, 399-431.
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., Ronchi, B., Nardone, A., (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience* 4, 1167-1183.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A., (2002). Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science* 85, 2173-2179.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A., (2005). Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88, 2017-2026.
- Calderon, F., Chauveau-Duriot, B., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M., Noziere, P., (2007). Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk during late pregnancy and the first three months of lactation. *Journal of Dairy Science* 90, 2335-2346.
- Calsamiglia, S., Rodríguez, M., (2012). Optimum vitamin nutrition in dairy cattle. In: J. Linden (editor). *Optimum Vitamin Nutrition*. DSM Nutritional Products Ltd, Basel, Switzerland, pp. 335-373.
- Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopez-Alonso, M., Pereira, V., Benedito, J.L., (2005). Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Veterinary Journal* 169, 286-292.
- Cohen, G., Hochstein, P., (1963). Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* 2, 1420-1428.
- CRV, (2015). CRV Yearstatistics 2015. Published April 2016 on <https://www.crv4all.be/download/jaarstatistieken-vlaanderen-2015/>
- De Bie, J., Langbeen, A., Verlaet, A., Florizoone, F., Immig, I., Hermans, N., Bols, P.E.J., Leroy, J.L.M.R., (2014). B-carotene supplementation to non-lactating dairy cows can restore b-carotene availability in the follicular environment under negative energy balance conditions. *Advances in Animal Biosciences* 5, 247-247.
- De Bie, J., Langbeen, A., Verlaet, A.A.J., Florizoone, F., Immig, I., Hermans, N., Fransen, E., Bols, P.E.J., Leroy, J.L.M.R., (2016). The effect of a negative energy balance status on β -carotene availability in serum and follicular fluid of nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 99, 5808-5819.
- de Ondarza, M.B., Engstrom, M., (2009). Can beta-carotene help dairy reproduction? *Feedstuffs* 81, 1-5.
- Drackley, J.K., Overton, T.R., Douglas, G.N., (2001). Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 84, Supplement, E100-E112.
- Festila, I., Miresan, V., Raducu, C., Cocan, D., Constantinescu, R., Coroian, A., (2013). Evaluation of oxidative stress in dairy cows through antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GPX) and superoxide dismutase (SOD). *Bulletin UASVM. Animal Science and Biotechnologies* 69, 107-110.
- Grummer, R.R., Mashek, D.G., Hayirli, A., (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice* 20, 447-470.
- James, D., (2012). Close the door on metabolic disease. Dairy update 31 August 2012.
- Johansson, B., Waller, K.P., Jensen, S.K., Lindqvist, H., Nadeau, E., (2014). Status of vitamins E and A and beta-carotene and health in organic dairy cows fed a diet without synthetic vitamins. *Journal of Dairy Science* 97, 1682-1692.
- Jukola, E., Hakkarainen, J., Saloniemi, H., Sankari, S., (1996). Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and beta-carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility. *Journal of Dairy Science* 79, 838-845.
- Kankofer, M., Albera, E., (2008). Postpartum relationship of beta carotene and vitamin a between placenta, blood and colostrum in cows and their newborns. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 116, 409-412.
- Kawashima, C., Nagashima, S., Sawada, K., Schweigert, F.J., Miyamoto, A., Kida, K., (2010). Effect of β -Carotene Supply During Close-up Dry Period on the Onset of First Postpartum Luteal Activity in Dairy Cows. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 45, e282-e287.
- Konvičná, J., Vargová, M., Paulíková, I., Kováč, G., Kostecká, Z., (2015). Oxidative stress and antioxidant status in dairy cows during prepartal and postpartal periods. *Acta Veterinaria Brno* 84, 133-140.

- LeBlanc, S.J., Herdt, T.H., Seymour, W.M., Duffield, T.F., Leslie, K.E., (2004). Peripartum serum vitamin E, retinol, and beta-carotene in dairy cattle and their associations with disease. *Journal of Dairy Science* 87, 609-619.
- Lee, J.Y., Kim, I.H., (2006). Advancing parity is associated with high milk production at the cost of body condition and increased periparturient disorders in dairy herds. *Journal of Veterinary Science* 7, 161-166.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F.C., (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science* 76, 2812-2823.
- Nayyar, S., Jindal, R., (2010). Essentiality of antioxidant vitamins for ruminants in relation to stress and reproduction. *Iranian Journal of Veterinary Research* 11, 1-9.
- Noziere, P., Grolier, P., Durand, D., Ferlay, A., Pradel, P., Martin, B., (2006). Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cows' plasma and milk following changes in forage and feeding level. *Journal of Dairy Science* 89, 2634-2648.
- NRC, (2001). Vitamins. In: *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. Seventh edition National Academic Press, Washington, DC, USA.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., (1967). Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70, 158-169.
- Quintela, L.A., Diaz, C., Becerra, J.J., Alonso, G., Gracia, S., Herradon, P.G., (2008). Role of beta-carotene and A vitamin in bovine reproduction: a review. *ITEA-Informacion Tecnica Economica Agraria* 104, 399-410.
- R-Core-Team, (2014). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reijs, J.W., Daatselaar, C.H.G., Helming, J.F.M., Jager, J., Beldman, A.C.G., (2013). Grazing dairy cows in North-West Europe - Economic farm performance and future developments with emphasis on the Dutch situation, *LEI Report 2013-001*. LEI Wageningen UR, the Hague, p. 124.
- Roche, J.F., (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science* 96, 282-296.
- Schweigert, F.J., Enjalbert, F., Mothes, R., Hurtienne, A., Immig, I., (2007). Cooperative European study for the validation of a novel cow-side beta-carotene assay in serum and blood. *13th International Conference on Production Disease in Farm Animals*. Leipzig, Germany, p. 162.
- Schweigert, F.J., Immig, I., (2007). Rapid assessment of beta-carotene status. *International Dairy Topics* 6, 15-17.
- Sharma, N., Singh, N.K., Singh, O.P., Pandey, V., Verma, P.K., (2011). Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 24, 479-484.
- Sies, H., (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry* 215, 213-219.
- Sordillo, L.M., Aitken, S.L., (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128, 104-109.
- Vernon, R.G., (2005). Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *Journal of Dairy Research* 72, 460-469.
- Wilkinson, J.M., Rinne, M., (2018). Highlights of progress in silage conservation and future perspectives. *Grass and Forage Science* 73, 40-52.

Detection of bovine papillomavirus in an equine cell line as a contaminant

Detectie van runderpapillomavirus in een paardencellijn als contaminant

¹Z. Akkutay-Yoldar, ¹T. Oğuzoğlu, ²F. Doğan, ²V. Ataseven

¹Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Dışkapı, 06110, Ankara, Turkey

²Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Mustafa Kemal University, 31040 Hatay, Turkey

akkutay@ankara.edu.tr

ABSTRACT

Bovine papillomaviruses (BPV) are members of the family *Papillomaviridae*. Papillomaviruses are usually species-specific and epitheliotropic. Delta-BPVs are an exception to this rule in that they can also infect fibroblasts and non-bovid ungulates. Cell cultures are essential for performing in vitro studies, analysis of virus biology, vaccine production, tissue engineering and toxicity testing. In this context, cell line contamination constitutes a significant problem. In this study, various cell lines (n=27) were assessed for potential BPV contamination. To this aim, DNA was extracted from cell cultures and then screened for the presence of papillomavirus L1 capsid gene DNA using a consensus polymerase chain reaction (PCR) system. Immunofluorescence (IF) staining was used for viral protein detection. Intriguingly, one cell line derived from equine dermis tested positive by PCR and subsequent IF staining for L1. Amplicon sequencing followed by computed L1 DNA sequence alignment led to the identification of a new putative BPV type, revealing the highest identities with Delta-BPV types 1 (76%) and 2 (73%). To the authors' knowledge, this is the first report on the presence of a putative BPV as a viral contaminant in cell cultures that possibly represents an unknown Delta-BPV.

SAMENVATTING

Boviene papillomavirussen (BPV) behoren tot de familie van *Papillomaviridae*. Papillomavirussen zijn meestal soortspecifiek en epitheliotroop. Delta-BPVs vormen een uitzondering op deze regel omdat ze ook fibroblasten en niet-boviene hoefdieren kunnen infecteren. Celcultuur is essentieel voor het uitvoeren van in-vitrostudies, analyse van virusbiologie, vaccinproductie, weefselmanipulatie en toxiciteitstesten. In deze context vormt cellulaire contaminatie een aanzienlijk probleem. In de voorliggende studie werden verscheidene cellijnen (n = 27) beoordeeld op mogelijke BPV-besmetting. Voor dit doel werd DNA geëxtraheerd uit een celcultuur en vervolgens gescreend op de aanwezigheid van papillomavirus L1-capsidegen DNA met behulp van een consensus-polymerasekettingreactie (PCR)-systeem. Immunofluorescentiekleuring (IF) werd gebruikt voor de detectie van virale eiwitten. Opmerkelijk was dat één cellijn afgeleid van paardendermis positief testte met PCR en met de daaropvolgende IF-kleuring voor L1. Amplicon-sequencing gevolgd door L1-DNA-sequentievergelijking leidde tot de identificatie van een vermoedelijk nieuw BPV-type dat de grootste gelijknissen met Delta-BPV-typen 1 (76%) en 2 (73%) vertoonde. Volgens de auteurs is dit het eerste rapport over de aanwezigheid van een vermeende BPV als een virale contaminant in celculturen die mogelijk een tot nu toe onbekende Delta-BPV vertegenwoordigt.

INTRODUCTION

Papillomaviruses (PV) are non-enveloped, icosahedral viruses containing a circular double-stranded DNA genome. They have the potential to establish a latent infection and cause tumor formation in cutaneous and/or mucosal epithelia. PVs are usually epitheliotropic host-specific viruses that are found in a wide range of vertebrate species (Nasir and Campo, 2008; Rector and Ranst, 2013). Alike all PVs, bovine papillomaviruses (BPVs) are members of the family *Papillomaviridae* (De Villiers et al., 2004; Lancaster, 1981). To date, twenty-four BPV genotypes are known, and are classified into the genera, *Deltapapillomavirus* (BPV 1, 2, 13, 14), *Epsilonpapillomavirus* (BPV 5, 8), *Dyoxipapillomavirus* (BPV 7), *Xipapillomavirus* (BPV 3, 4, 6, 9, 10, 11, 15), and *Dyokappapapillomavirus* (BPV 16, 22) (Ataseven et al., 2016; Bauermann et al., 2017; Da Silva et al., 2016). Interestingly, Delta-BPVs can also infect dermal fibroblasts and are less species-specific than other PVs. In addition to cattle, they also infect other ruminant species as well as equids. In bovids, BPVs mainly induce benign papillomas that regress spontaneously. In some cases however, several types such as BPV4 are involved in the development and progression of squamous cell carcinomas (Nasir and Campo, 2008). In equids, BPV-1 and BPV-2 are the causative agents of persistent, locally invasive skin lesions termed sarcoids, which are the most common tumor type in horses (Chambers et al., 2003).

Microbial contamination of cell cultures with bacteria, yeasts, viruses or mycoplasma, is the most common problem encountered in cell culture laboratories. Consequences include viral interference, misidentification, cell integrity damage, falsification of research results, mutations and health hazard to the laboratory personnel (Mirjalili et al., 2005). To increase the sensitivity of studies and the reliability of test results, and to reduce the waste of expensive biological reagents, such as enzymes, antibodies, or media, cell cultures need to be assessed for microbial contamination whenever applicable.

The authors have previously assessed cell culture systems and sera in their laboratory for contaminations with non-cytopathogenic pestiviruses and did not detect these viruses. In the present study, the screening of various, established primary cell lines that are routinely used in the laboratory for contamination with papillomaviruses, is reported. To the best of the authors' knowledge, this study is the first to describe the contamination of a cell line by a bovine papillomavirus (BPV).

MATERIALS AND METHODS

Cell lines originating from cattle, rabbits, horses, hamsters, cats, dogs, monkeys and humans were ob-

tained from the cell culture collection of the Department of Virology (Faculty of Veterinary Medicine of the Ankara University). Twenty-seven different cell lines, including five homologous cell lines from various sources, and fetal sera for media preparation were tested for papillomavirus contamination (Table 1). To this aim, cells were maintained at 37°C in a 5%-CO₂ atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (Biochrom AG, Berlin, Germany), containing 100 µg streptomycin and 100 IU penicillin per ml as well as 10% fetal bovine serum (Biochrom AG). After five days, cells were harvested and subjected to total DNA extraction according to the phenol:chloroform:isoamyl alcohol extraction method described by Sambrook and Russell (2001). The resulting DNA pellets were resuspended with 20 µl of deionized water. Respective DNA concentrations were determined using a Picodrop Microliter UV/Vis spectrophotometer (Picodrop, Cambridge, UK). Then, DNA isolates were stored at -20°C until use. Polymerase chain reaction (PCR) of papillomavirus was performed according to Forslund et al. (1999) using degenerate primers FAP59/64 (5'-TAACWGTIG-GICAYCCWTATT-3' and 5'-CCWATATCWVHCATITCICCATC-3') for amplification of a 478-bp region within the PV *L1* capsid gene. Reactions were carried out in a total volume of 30 µl containing 5 U *Taq* DNA polymerase (MBI Fermentas, Waltham, MA, USA), 3 µl of 10XTaq Buffer (MBI), 25 mM MgCl₂, 10 pmol of each primer, 10 mM dNTP mix (MBI), 18.1 µl of sterile water (18 MOcm, Appli-chem, Darmstadt, Germany), and 3 µl of extracted DNA. An initial denaturation step at 94°C for 10 minutes was followed by 40 cycles of DNA denaturation at 94°C for 50 seconds, primer annealing at 51°C for 55 seconds, and DNA elongation at 72°C for 50 seconds. Finally, reaction tubes were kept at 72°C for a further 10 minutes for final extension. PCR products were visualized in a UV-transilluminator following electrophoresis in 1%-agarose gels containing ethidium bromide. PCR products of expected size (478 bp) were gel-extracted using a Gene JET PCR purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), and PCR fragments were sent to a commercial company (RefGen, Ankara, Turkey) for Sanger sequencing. The sequences obtained were aligned by using CLC Main Workbench v5.5 (CLC Bio, Aarhus, Denmark) and analyzed with MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013). Maximum-likelihood trees were generated based on the Kimura two-parameter model with 1,000 bootstrap replicates (Figure 1). Partial sequences of the *L1* gene were submitted to the NCBI GenBank database and were assigned the accession number KY592382.

For the immunofluorescent assay, PCR-positive equine dermal (ED) cells, as well as NBL-6 cell line used as negative control, were seeded onto 24-well plates and grown for 48 hours (Figure 2). Then, cells were fixed with 4% formalin for 30 minutes at 4°C, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in phosphate-

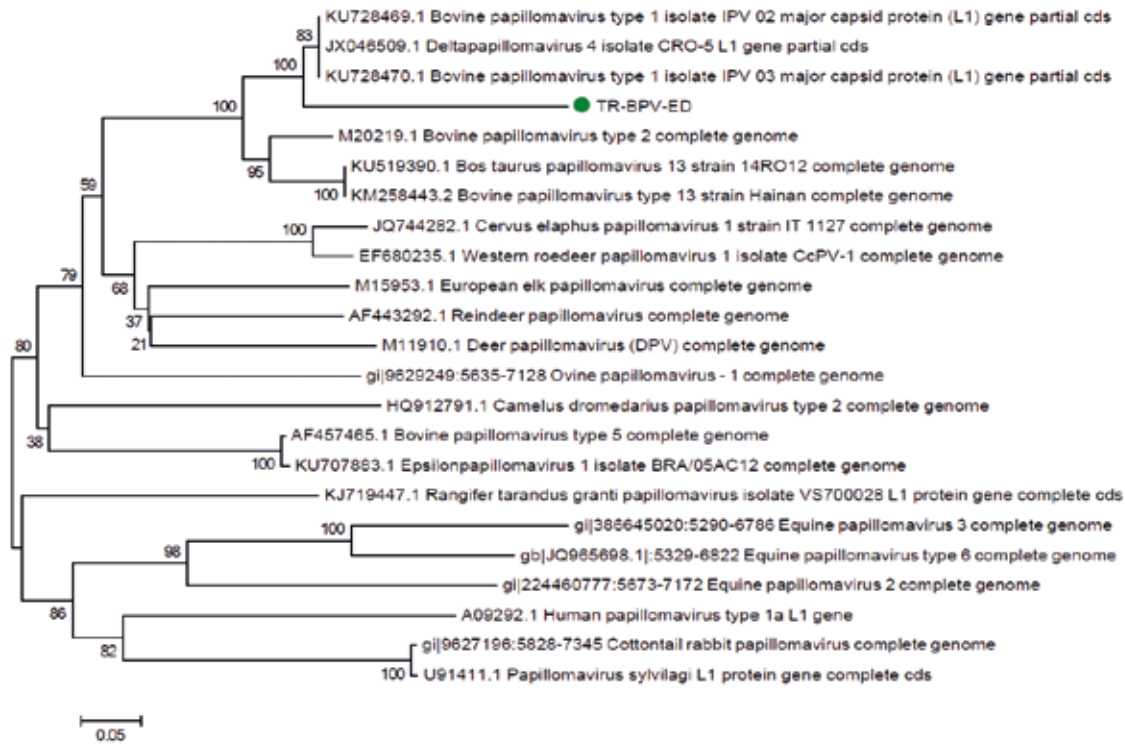


Figure 1. The comparison of known papillomavirus types with TR-BPV-ED based on partial L1 protein coding sequences using neighbor-joining method. Virus types represented are indicated by name following GenBank accession number. The optimal tree with the sum of branch length = 3.81460836 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

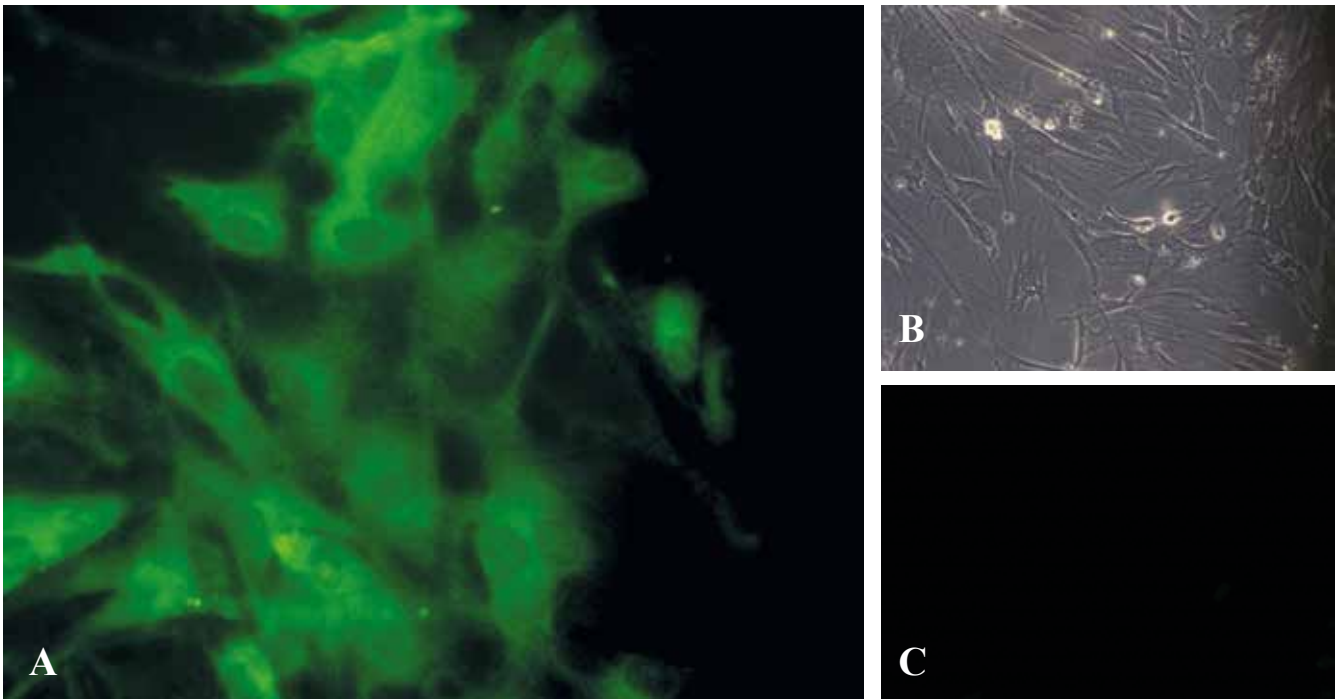


Figure 2. A. Immunofluorescence staining of ED cells infected with papillomavirus using BPV-1 E2 specific monoclonal antibody (20X). B. Image of ED cells by light microscope (20X). C. Image of NBL-6 cell line as a negative control.

Table 1. Investigated cells.

Cell line	Reference	Description
RK-13	ATCC® CCL-37™	European rabbit kidney cell line
MA104	ATCC® CRL-2378.1™	African green monkey kidney cell line
MDBK	ATCC® CCL-22™	Madin-Darby bovine kidney cell line
Vero E6	ATCC® CRL-1586™	African green monkey kidney cell line
NBL 6	ATCC® CCL-57™	Equine dermal fibroblast cell line
ED	Permanent cell line ¹	Equine dermal fibroblasts
MDCK	ATCC® CRL-2935™	Canine kidney cell line
CRFK	ATCC® CCL-94™	Crandell Reese feline kidney cell line
BHK-21	ATCC® CCL-10™	Baby hamster kidney cell line
HCT-8	ATCC® CCL-244™	Human colonic adenocarcinoma cell line
NEL-M1	Primary cell line ²	Human melanoma cells
SFT-R	CVCL-RIE 0043	Ovid thymus cell line
FCWF	ATCC® CRL-2787™	Feline whole fetus cell line
ECF-R	CLS ID 601469	Chicken embryo fibroblastoid cell line
FL	ATCC® CCL-62™	HeLa contaminant
HEL	ATCC® TIB-180™	Human erythroleukemia cell line
FEL	Primary cell line ³	Feline embryonic lung cells
SK-6	CCLV-RIE 0262	Swine kidney-6 cell line
FBLC	Primary cell line ⁴	Immortalized fetal bovine lung cells
PK-15	ATCC® CCL-33™	Swine kidney cells
FBKC	Primary cell line ⁵	Immortalized fetal bovine kidney cells
BT	Primary cell line ⁶	Bovine turbinate cell line

¹ Anonymous cell line from cell culture collection in the lab of the authors.

² DiSorbo D.M., et al. (1985).

³⁻⁶ Oğuzoğlu T.C. (2003-2006) (unpublished).

buffered saline (PBS) for 10 minutes at 4°C and blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 minutes at room temperature. Subsequently, cells were incubated with anti-BPV-1 E2 monoclonal antibody 1H10 (Thermo Fisher Scientific, catalog # MA1-71539,) at a dilution of 1:1,000 in PBS containing 3% BSA at 4°C overnight. After washing, cells were incubated with Alexa Fluor Plus 488 goat anti-mouse IgG as a secondary antibody (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, catalog # A32723) at a dilution of 1:1,000 for 3 hours at 4°C. Immunofluorescence was visualized using the Zeiss Axio Observer microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany).

RESULTS

Consensus PCR was used to screen 27 cell lines and sera for papillomavirus DNA. Overall, 26 cell lines and 6 batches of serum samples tested negative by this assay. In contrast, DNA extracted from ED cell line (initial concentration of 393.26 ng/ml) derived from equine dermis had scored positive. Consequently, the resulting amplicon was sequenced. Subsequent alignment with sequences deposited in the GenBank revealed this amplicon sequence to be 40.1–76.3% identical to various BPV strains.

Comparison of the sequence in the present study with other genomic papillomavirus sequences derived

from many different species, i.e. cow, camel, deer, elk, reindeer, caribou, sheep, horse, rabbit and human, was carried out (Figure 1). Divergence and percent identity are shown in Figure 3. Homology analyses revealed a 76.3% identity of the sequence of this study, termed TR-BPV-ED, to BPV-1 isolate CRO-5. This relationship represented the highest similarity among the compared sequences. This sequence also showed 71.8% identity with BPV-2, followed by a sequence identity of 70.2% with *Bos taurus* papillomavirus 13 strain 14RO12 and BPV-13 strain Hainan. BPV type 5 and *Epsilonpapillomavirus* 1 showed only 56.3% and 56.1% identity with TR-BPV-ED, respectively. Equine papillomavirus-2, equine papillomavirus-3, and equine papillomavirus-6 complete genomes shared identities of 44.8%, 40.1%, and 42.7%, respectively, with TR-BPV-ED. Genetic similarity with equine papillomavirus-3 amounted to 40.1%. Human papillomavirus type 1 shared 48.8% sequence identity with TR-BPV-ED.

Moreover, *Papillomavirus sylvilagi* and cottontail rabbit papillomavirus exhibited 49.8% and 50.0% identity, respectively. Ovine papillomavirus shared 55.2% identity with TR-BPV-ED. In regard to deer and camel papillomavirus strains, *Cervus elaphus* papillomavirus 1 strain IT 1127 and *Camelus dromedarius* papillomavirus type 2 shared sequence identities of 56.8% and 53.8% with TR-BPV-ED, respectively. European elk papillomavirus, reindeer pap-

Table 2. List of sequences used in the phylogenetic analysis of PVs.

Virus strain	Accession Number	Nucleotide identities
Bovine papillomavirus type 1 isolate IPV 03 major capsid protein (L1) gene partial cds	KU728470.1	76.3%
Bovine papillomavirus type 1 isolate IPV 02 major capsid protein (L1) gene partial cds	KU728469.1	76.3%
Deltapapillomavirus 4 isolate CRO-5 L1 gene partial cds	JX046509.1	73.2%
Bovine papillomavirus type 2 complete genome	M20219.1	71.8%
Bos taurus papillomavirus 13 strain 14RO12 complete genome	KU519390.1	70.2%
Bovine papillomavirus type 13 strain Hainan complete genome	KM258443.2	70.2%
Deer papillomavirus (DPV) complete genome	M11910.1	59.4%
European elk papillomavirus complete genome	M15953.1	58.9%
Reindeer papillomavirus complete genome	AF443292.1	58.9%
Western roe deer papillomavirus 1 isolate CcPV-1 complete genome	EF680235.1	57.0%
Cervus elaphus papillomavirus 1 strain IT 1127 complete genome	JQ744282.1	56.8%
Bovine papillomavirus type 5 complete genome	AF457465.1	56.3%
Epsilonpapillomavirus 1 isolate BRA/05AC12 complete genome	KU707883.1	56.1%
Ovine papillomavirus - 1 complete genome	gi 9629249:5635-7128	55.2%
Camelus dromedarius papillomavirus type 2 complete genome	HQ912791.1	53.8%
Rangifer tarandus granti papillomavirus isolate VS700028 L1 protein gene complete cds	KJ719447.1	53.1%
Cottontail rabbit papillomavirus complete genome	gi 9627196:5828-7345	50%
Papillomavirus sylvilagi L1 protein gene complete cds	U91411.1	49.8%
Human papillomavirus type 1a L1 gene	AO9292.1	48.8%
Equine papillomavirus 2 complete genome	gi 224460777:5673-71272	44.8%
Equine papillomavirus type 6 complete genome	gb JQ965698.1: 5329-6822	42.7%
Equine papillomavirus 3 complete genome	gi 386645020:5290-6786	40.1%

illomavirus, deer papillomavirus, western roe deer papillomavirus 1 isolate CcPV-1, and *Rangifer tarandus granti* papillomavirus isolate VS700028 showed identities of 58.9%, 58.9%, 59.4%, 57.0% and 53.1%, respectively (Table 2).

Immunofluorescence (IF) staining of ED cells using BPV-1 E2-specific monoclonal antibody yielded a strong signal, while NBL-6 cells scored negative, thus testifying for the specificity of the detection system and reliability of results (Figure 2).

DISCUSSION

Screening of various cell lines and sera for papillomavirus DNA yielded a positive result in case of a cell line derived from equine dermis. The DNA sequence of the obtained amplification product, termed TR-BPV-ED, was genetically more closely related to BPV types than to equine papillomavirus types. The IF staining results were in agreement with this finding, yielding a strong signal when using a BPV-1 E2-specific antibody. Sera used in culture media passage were also tested by PV consensus PCR for papillomavirus contamination but scored consistently negative.

Due to difficulties related to virus isolation, it became necessary to frequently assess cell cultures for viral contaminations. In a previous experiment, all cell lines had tested negative for pestivirus contamination. It is known that pestiviruses generally replicate without inducing a cytopathogenic effect (CPE); they are transmitted by fetal calf sera and interfere with replication of other viruses in cell culture (Merten, 2002). Therefore, cell lines were also tested for contamination

by other viruses including papillomaviruses.

A total of 27 cell lines derived from eight different species and 22 different tissues were examined by PCR using PV consensus primers that amplify a region within the *L1* major capsid gene. Only the ED cell line tested positive in this study. Phylogenetically, the DNA sequence of the obtained PCR product, TR-BPV-ED, was compared to papillomavirus sequences deposited in the GenBank database. Sequence alignment revealed a 40.1–76.3% nucleotide identity with other papillomavirus types from homologous and heterologous hosts. Comparison with BPV-1 sequences originating from cattle and horses showed that TR-BPV-ED was 73.2–76.3% identical to other BPV-1 variants. The isolate in the present study was located on the same branch with *Deltapapillomaviruses* BPV-1, BPV-2, BPV-13, and BPV-14 on the phylogenetic tree, whereas with other papillomavirus types derived from humans and other mammals, i.e. rabbit, camel, deer, elk, horse, sheep, and cattle, PV types were located on distinct genetic branches. BPV infection was detected in an in vitro system where numerous cell culture passages had already been performed. This may explain the genetic aberrations of TR-BPV-ED in comparison to its closest relative, BPV1. On the other hand, DNA viruses are genetically stable viruses. Therefore, it can rather be assumed that an L1 region was amplified corresponding to a yet unknown BPV type. Future whole-genome analysis will help to clarify this issue and provide a better understanding of the genetic diversity of TR-BPV-ED isolates detected from the ED cell line.

Papillomaviruses may establish a persistent infection under the influence of endogenous and environ-

mental factors, and this may increase the spread of viruses by cattle to the same and, in case of Delta-BPVs, other ungulate species (Gil da Costa et al., 2017). Although there are reports on the detection of BPV types 1 and 2 from bovine skin, blood, milk and semen (Santos et al., 2016) in horses, the vast majority of published reports provide evidence that BPV1/2 infection in equids is exclusively associated with sarcoid disease (Nasir and Reid, 2006; Nasir and Campo, 2008; Otten et al., 1993). In one study, it has been reported that sarcoid tumors in cats may be associated with *Deltapapillomavirus* 14 (BPV-14) infection, another example of the broader host spectrum of Delta-BPVs (Munday et al., 2015). Herein, the described papillomavirus sequence was detected from an ED cell line, thus opening the possibility that infection had already been present in the horse from which the cells were explanted (Chambers et al., 2003). Since the ED cell line was provided by collaboration partners many years ago, the exact source of infection/contamination could not be identified. There are some factors that may explain this contamination in ED cell culture. First, horses can be naturally infected by putatively new Delta-BPV, and contaminated ED cell cultures might have been obtained from these naturally infected equids. Therefore, BPV DNA could have been in the ED cell culture from the very beginning. The results of immunofluorescence staining also support that the virus expresses its proteins, at least the early ones. In equine sarcoids, BPV-1 DNA resides in infected cells in an episomal form. In addition, infection may be productive, at least at some stages of disease. There is evidence of the presence of L1 protein and virion assembly in the upper epidermal layer (Bogaert et al., 2010; Brandt et al., 2011). Moreover, Wilson et al. (2013) have visualized BPV-1 virions

in sarcoid tissue by electron microscopy. The ED cell line used in this study is unlikely to support productive infection as it does not provide the proper cellular environment for virion assembly (Doorbar, 2005).

To date, many different PVs have been shown in the skin and mucous membranes of humans and animals. Given the fact that more than two hundred human papillomavirus types are known today, it is more than likely that many novel BPV types will be discovered in the near future. The putative BPV DNA detected in this study is most similar to BPV-1 DNA, with a difference of 24.7%. These results suggest that the obtained viral DNA may represent a putative new type.

Secondly, bovine sera previously used by cooperating researchers might have been contaminated with BPV. Finally, the contamination could have emerged due to laboratory contamination, as animal papillomavirus plasmid vector systems are often used to study molecular and cell biology (Gil da Costa et al., 2017). During these studies, BPV-derived plasmids might have contaminated ED cell cultures, which are frequently exchanged among laboratories, and hence, it is possible that the authors came into possession of such cultures.

CONCLUSION

According to immunofluorescence and sequencing results, viral contamination found in ED cell line could either stem from 1. the animal, from which the cells were initially explanted, 2. from contaminated fetal bovine serum, or 3. from BPV-derived plasmid vectors before the cell line was provided. Therefore, according to the findings of this study, it is highly

Percent Identity																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
1	█	44.8	40.1	42.7	48.8	50.0	49.8	55.2	58.9	58.9	56.8	59.4	57.0	56.3	56.1	53.1	53.8	76.3	76.3	73.2	71.8	70.2	70.2	1	TR-BPV-type-1
2	95.2	█	57.3	58.0	54.0	59.2	59.2	54.2	57.0	55.9	54.7	56.8	54.7	55.6	55.2	53.5	53.3	51.4	51.4	50.2	54.7	53.3	53.3	2	5673-7172
3	109.1	58.9	█	73.5	49.5	52.1	52.1	54.5	51.9	54.2	50.2	55.2	50.7	53.1	53.5	54.7	49.8	46.2	46.2	45.3	49.5	49.3	49.3	3	5290-6786
4	100.6	60.4	30.8	█	51.9	55.2	54.9	52.6	53.8	55.2	53.3	54.0	52.1	55.6	54.9	56.6	54.7	49.3	49.5	48.4	52.8	52.6	52.6	4	JQ965698.1
5	82.1	69.0	78.4	74.1	█	63.1	63.4	56.6	54.9	56.8	57.3	57.3	57.3	58.5	58.7	59.2	57.7	53.1	53.3	50.9	58.2	58.0	58.0	5	A09292.1
6	78.3	58.6	73.2	68.0	49.6	█	99.1	57.5	57.5	56.6	54.5	57.7	53.3	58.5	58.5	58.2	55.6	55.4	55.4	53.3	59.2	61.0	61.0	6	5828-7345
7	79.0	58.7	73.3	68.7	49.0	0.9	█	57.5	57.7	56.8	54.9	57.3	53.8	58.2	58.0	58.7	55.6	55.2	55.2	53.1	58.9	60.8	60.8	7	U91411.1
8	67.7	68.8	64.2	72.3	64.3	61.0	61.1	█	68.3	70.2	67.8	66.9	68.1	65.5	65.5	60.6	63.1	62.4	62.7	60.8	70.0	68.1	68.1	8	5635-7128
9	58.1	61.4	71.4	69.1	68.5	60.9	60.3	42.4	█	74.9	71.8	73.5	74.6	65.3	65.0	60.6	60.1	65.7	65.7	63.8	71.4	70.0	70.0	9	M15953.1
10	58.5	64.1	64.8	65.5	63.4	63.4	62.7	39.2	31.5	█	73.0	73.7	72.5	65.3	65.5	59.9	62.9	64.3	64.6	63.1	70.9	67.8	67.8	10	AF443292.1
11	63.0	66.8	75.7	70.5	62.5	68.4	67.1	43.4	36.3	34.5	█	71.1	91.8	66.2	66.2	61.5	62.7	64.8	65.0	63.4	70.9	70.2	70.2	11	JQ744282.1
12	57.5	62.2	62.8	68.4	62.2	60.7	61.8	45.0	33.6	33.2	37.4	█	71.6	65.7	66.0	61.7	62.2	67.1	67.4	66.0	69.2	70.0	70.0	12	M11910.1
13	62.6	67.0	74.7	73.6	62.5	71.5	70.1	43.3	31.8	35.4	8.9	36.7	█	66.4	66.4	62.0	63.1	64.3	64.3	63.4	69.2	68.8	68.8	13	EF680235.1
14	63.3	65.2	68.5	65.2	58.8	59.1	59.7	46.6	47.8	47.5	45.3	46.3	45.0	█	99.3	64.8	64.8	62.9	63.1	62.0	66.7	66.4	66.4	14	AF457465.1
15	64.0	66.4	67.1	67.0	58.3	59.1	60.2	46.6	48.3	47.1	45.3	45.9	45.0	0.7	█	64.3	64.8	62.7	62.9	61.7	66.4	66.2	66.2	15	KU707883.1
16	68.2	71.5	65.1	63.6	56.3	60.3	59.3	53.9	53.5	55.7	51.5	51.3	50.5	46.0	46.9	█	61.7	58.5	58.7	56.3	63.4	63.1	63.1	16	KJ719447.1
17	68.3	71.6	79.2	68.8	60.5	66.9	66.9	51.1	57.6	51.7	51.6	52.5	51.1	47.6	47.6	51.9	█	59.6	59.9	58.2	64.8	65.3	65.3	17	HQ912791.1
18	21.2	66.6	78.1	72.3	63.7	57.5	58.0	45.7	39.7	41.8	40.8	36.9	41.9	43.7	44.2	49.9	49.4	█	99.8	94.1	80.5	80.5	80.5	18	KU728470.1
19	21.2	66.7	78.2	71.6	63.2	57.6	58.1	45.3	39.7	41.4	40.4	36.5	42.0	43.3	43.8	49.4	48.9	0.3	█	94.4	80.8	80.8	80.8	19	KU728469.1
20	23.5	66.9	78.0	72.2	66.5	60.1	60.7	46.6	40.8	41.6	41.1	36.6	41.2	43.0	43.5	52.0	49.8	0.3	0.0	█	78.6	78.6	78.6	20	JX046509.1
21	33.2	67.2	77.6	71.7	59.9	57.6	58.1	39.6	37.3	38.1	38.0	40.9	41.1	44.5	45.0	47.8	47.2	15.9	15.6	16.3	█	89.7	89.7	21	M20219.1
22	35.8	70.7	79.1	72.7	60.5	53.5	53.9	42.6	39.6	43.5	39.0	39.5	41.8	44.7	45.2	48.5	46.5	15.8	15.5	16.2	11.3	█	100.0	22	KU519390.1
23	35.8	70.7	79.1	72.7	60.5	53.5	53.9	42.6	39.6	43.5	39.0	39.5	41.8	44.7	45.2	48.5	46.5	15.8	15.5	16.2	11.3	0.0	█	23	KM258443.2

Figure 3. Nucleic acid identities and divergences of TR-BPV-ED and other papillomavirus types.

recommended that cells and fetal sera should be used only after being screened for papillomaviruses, besides non-cytopathogenic viruses (pestivirus), to ensure that the results obtained from cell culture studies are accurate and reliable. In this study, cell cultures were investigated for the presence of bovine papillomavirus as a viral contaminant in cell cultures for the first time. In further studies, the entire genome of the probably new BPV type detected from the ED cells needs to be genetically and biologically analyzed, to uncover its identity and possible pathogenic role in equine and/or bovine disease.

REFERENCES

- Ataseven V.S., Kanat Ö., Ergün Y. (2016). Molecular identification of bovine papillomaviruses in dairy and beef cattle: First description of Xi-and Epsilonpapillomavirus in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 40 (6), 757-763.
- Bauermann F.V., Joshi L.R., Mohr K.A., Kutish G.F., Meier P., Chase C., Christopher-Hennings J., Diel D.G. (2017). A novel bovine papillomavirus type in the genus Dyokappapapillomavirus. *Archives of Virology* 162 (10), 3225-3228.
- Bogaert L., Martens A., Kast W.M., Van Marck E., De Cock H. (2010). Bovine papillomavirus DNA can be detected in keratinocytes of equine sarcoid tumors. *Veterinary Microbiology* 146 (3-4), 269-275.
- Borzacchiello G., Roperto F. (2008). Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. *Veterinary Research* 39 (5), 1.
- Brandt S., Tober R., Corteggio A., Burger S., Sabitzer S., Walter I., Kainzbauer C., Steinborn R., Nasir L., Borzacchiello, G. (2011). BPV-1 infection is not confined to the dermis but also involves the epidermis of equine sarcoids. *Veterinary Microbiology* 150 (1-2), 35-40.
- Chambers G., Ellsmore V.A., O'Brien P. M., Reid S.W.J., Love S., Campo M.S., Nasir L. (2003). Association of bovine papillomavirus with the equine sarcoid. *Journal of General Virology* 84 (5), 1055-1062.
- Da Silva, F.R.C., Cibulski S.P., Daudt C., Weber M.N., Guimarães L.L., Streck A.F., Mayer F.Q., Roehe P.M., Canal C.W. (2016). Novel bovine papillomavirus type discovered by rolling-circle amplification coupled with next-generation sequencing. *PLoS one* 11 (9), e0162345.
- Doorbar J. (2005). The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32, 7-15.
- De Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology* 324 (1), 17-27.
- Forslund O., Antonsson A., Nordin P., Stenquist B.O., Hansson, B.G. (1999). A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin. *Journal of General Virology* 80 (9), 2437-2443.
- Gil da Costa R.M., Peleteiro M.C., Pires M.A., Di Maio D. (2017). An update on canine, feline and bovine papillomaviruses. *Transboundary and Emerging Diseases* 64 (5), 1371-1379.
- Lancaster W.D. (1981). Apparent lack of integration of bovine papillomavirus DNA in virus-induced equine and bovine tumor cells and virus-transformed mouse cells. *Virology* 108 (2), 251-255.
- Merten O.W. (2002). Virus contaminations of cell cultures—a biotechnological view. *Cytotechnology* 39 (2), 91-116.
- Mirjalili A., Parmoor E., Bidhendi S.M., Sarkari B. (2005). Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. *Biologicals* 33 (2), 81-85.
- Munday J.S., Thomson N., Dunowska M., Knight C.G., Laurie R.E., Hills S. (2015). Genomic characterisation of the feline sarcoid-associated papillomavirus and proposed classification as *Bos taurus* papillomavirus type 14. *Veterinary Microbiology* 177 (3-4), 289-295.
- Nasir L., Reid S.W. (2006). Bovine papillomaviruses and equine sarcoids. In: Campo, M.S. (editor), *Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond*, Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2006, 1, 389-397.
- Nasir L., Campo M.S. (2008). Bovine papillomaviruses: their role in the aetiology of cutaneous tumours of bovinds and equids. *Veterinary Dermatology* 19 (5), 243-254.
- Otten N., von Tscharnher C., Lazary S., Antczak D.F., Gerber H. (1993). DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. *Archives of Virology* 132 (1-2), 121-131.
- Rector A., Van Ranst M. (2013). Animal papillomaviruses. *Virology* 445, (1-2), 213-223.
- Sambrook J., Russell D.W., Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual (3-volume set)* (Vol. 999). New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Santos E.U.D., Silva M.A.R., Pontes N.E., Coutinho L.C.A., Paiva S.S.L., Castro R.S., Freitas A.C. (2016). Detection of different bovine papillomavirus types and co-infection in bloodstream of cattle. *Transboundary and Emerging Diseases* 63 (1), e103-e108.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12), 2725-2729.
- Trewby H., Ayele G., Borzacchiello G., Brandt S., Campo M.S., Del Fava C., Marais J., Leonardi L., Vanselow B., Biek R., Nasir L. (2014). Analysis of the long control region of bovine papillomavirus type 1 associated with sarcoids in equine hosts indicates multiple cross-species transmission events and phylogeographical structure. *The Journal of General Virology* 95 (12), 2748.
- Wilson A.D., Armstrong E.L.R., Gofton R.G., Mason J., De Toit N., Day M.J. (2013). Characterisation of early and late bovine papillomavirus protein expression in equine sarcoids. *Veterinary Microbiology* 162 (2-4), 369-380.

Diagnostische parameters voor klinische wintercyathostominose bij paarden

Diagnostic parameters for clinical larval cyathostominosis in horses

^{1,2}L.M. Verhaeghe, ²B. Pardon, ²P. Deprez, ³E. Claerebout

¹EquiTom, Paalstraat 8, B-3560 Meldert

²Vakgroep Inwendige Ziekten van de Grote Huisdieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

³Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

lizemaria.verhaeghe@gmail.com

SAMENVATTING

Wintercyathostominose is een van de belangrijkste parasitaire aandoeningen bij het grazende paard. Deze studie werd opgezet om de meest significante parameters te identificeren die geassocieerd zijn met klinische wintercyathostominose. Het betreft een retrospectief onderzoek van 307 paarden die tussen 2008 en 2018 aangeboden werden op de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Gent. Paarden ouder dan drie maanden die op de faculteit een mestonderzoek ondergingen en diarree hadden, werden opgenomen in de studie. De diagnose van larvale cyathostominose werd gesteld op basis van een positief mestonderzoek, i.e. het aantonen van L4-larven in de feces. De gegevens van paarden met larvale cyathostominose zonder diarree werden niet in de studie opgenomen. Klinische, biochemische, hematologische en parasitaire parameters werden onderzocht. Na statistische analyse van deze retrospectieve gegevens kwam albumine als meest significante parameter naar voor. Een serum-albuminegehalte dat lager was dan 20 g/L, had een hoge gevoeligheid voor het voorspellen van een positief mestonderzoek. De combinatie van het serum-albuminegehalte, het geslacht, de lichaamstemperatuur, het neutrofielenpercentage en het seizoen was volgens het finale statistische model de beste combinatie om de aanwezigheid van wintercyathostominose te voorspellen. Aan de hand van de diagnostische accuraatheid van het finale model werd aangetoond dat hiermee echter geen sluitende diagnose van larvale cyathostominose kan gesteld worden en dat een mestonderzoek nog steeds noodzakelijk is om het vermoeden van larvale cyathostominose te bevestigen.

ABSTRACT

The objective of this study was to find the most significant parameters to identify horses with larval cyathostominosis, caused by infection with small strongyles. A retrospective study with 307 horses, that were presented at the Faculty of Veterinary Medicine (Ghent University) between 2008 and 2018, was performed. Horses older than three months with diarrhea, of which feces was examined at the Faculty of Veterinary Medicine, were included in this study. The definitive diagnosis of larval cyathostominosis was determined by the presence of L4/L5 larvae in the feces. Clinical examinations, blood and fecal analyses were performed in all cases and compared to determine positive predictive values for larval cyathostominosis. Blood albumin concentration appeared to be the most significant value. Albumin concentrations less than 20 g/L had the highest significance (<0.004) to predict a positive fecal sample. The combination of an albumin concentration less than 20 g/L, sex (female), body temperature (>38.2°C), neutrophilia (>67%) and season (October-March) was the most accurate (72%) in predicting the presence of larval cyathostominosis. Due to the moderate significance of this model, fecal examination remains essential to confirm larval cyathostominosis suspicion.

INLEIDING

Epidemiologie

In tegenstelling tot de sterke daling van de prevalentie van grote strongyliden, blijven kleine strongyliden van groot veterinair belang (Kaplan en Nielsen, 2010). Alle grazende paarden worden met kleine strongyliden of Cyathostominae besmet (Reinemeyer, 1986). Bij paarden zijn Cyathostominae wereldwijd de belangrijkste bron voor weidebesmetting. Niettegenstaande de prevalentie van Cyathostominae bij paarden zeer hoog is, is de morbiditeit laag en vertonen de meeste dieren geen acute symptomen van ongemak of ziekte (Love et al., 1999). Wanneer er zich slechts een klein aantal Cyathostominae-larven ontwikkelt, vertoont het paard geen ziektesymptomen. Het massaal en synchroon vrijkomen van de geïnhibeerde L4- of L5-larven uit de darmwand kan echter extreme gevolgen hebben, i.e. larvale cyathostominose (Peregrine et al., 2005). Seizoengebonden, klinische cyathostominose wordt in Europa wintercyathostominose genoemd (Lyons et al., 2000). Factoren die de duur van de hypobiose mede zouden kunnen bepalen, zijn de klimatologische omstandigheden, de grootte van de volwassen parasitaire populatie in de darm, species en gastheerimmunitet (Gasser et al., 2004). Ook het gebruik van anthelminthica zou een predisponerende factor zijn voor klinische cyathostominose, omdat luminale stadia een remmend effect zouden hebben op geëncysteerde larven. Bij het doden van de luminale stadia worden de geëncysteerde larven geactiveerd en treden ze uit de darmwand naar het lumen (Lyons et al., 2000).

Symptomen

Klinische symptomen worden in Europa vooral gezien in de late winter en de lente. Wintercyathostominose treft voornamelijk jonge paarden tussen één en drie jaar oud (Peregrine et al., 2005). Toch blijven paarden levenslang vatbaar en kan de ziekte voorkomen in elk seizoen van het jaar (Love et al., 1999).

De klinische symptomen worden veroorzaakt door ernstige tyflitis en colitis. De meest voorkomende klinische symptomen die gepaard gaan met larvale cyathostominose zijn gewichtsverlies, lethargie, acute of chronische diarree, koorts, subcutaan oedeem en koliek. Minder vaak worden ook tachycardie, verminderde kwaliteit van de vacht en spieratrofie vermeld (Giles et al., 1985; Love et al., 1999; Lyons et al., 2000; Mair et al., 2000; Proudman en Matthews, 2000; Peregrine et al., 2005). Ondanks intensieve behandeling geeft dit syndroom in 50% van de gevallen toch aanleiding tot sterfte (Proudman en Matthews, 2000). Alle bovengenoemde klinische parameters zijn elk afzonderlijk aspecifiek, waardoor ook andere parameters noodzakelijk zijn om de diagnose van larvale cyathostominose te kunnen stellen.

Diagnostiek

De huidige diagnose van larvale cyathostominose is gebaseerd op signalement (waarbij vooral de leeftijd van het paard een belangrijke rol speelt), anamnese, klinische symptomen en het uitsluiten van mogelijke andere oorzaken (Peregrine et al., 2005). De dierenarts is in staat het management te beoordelen en het infectierisico te bepalen. Bezettingsgraad, de kwaliteit van de weide, leeftijdsgroepen en coprologisch onderzoek zijn belangrijke indicatoren om de besmettingsgraad van de paarden of de weide te bepalen (Proudman en Matthews, 2012).

Hematologie en biochemie

Biochemische en hematologische parameters zijn tot op heden weinig specifiek. Meestal worden hypoalbuminemie, hyperglobulinemie, voornamelijk beta-globulinemie, en neutrofilie beschreven (Giles et al., 1985; Love et al., 1999; Smets et al., 1999; Corning, 2009). Dit zijn bevindingen die consistent zijn met “protein-losing enteropathy” (Corning, 2009). Over het plasmaproteïnegehalte bestaat er in de literatuur geen eenduidigheid. Volgens Giles et al. (1985) wordt eerst een normaal of verhoogd gehalte van het totale plasmaproteïnegehalte waargenomen door een stijging van plasmaglobulinen. Deze stijging wordt gevolgd door een daling. Volgens Corning (2009) is de stijging van het totale eiwitgehalte te wijten aan dehydratatie. Smets et al. (1999) en Peregrine et al. (2005) beschreven enkel een significante daling van het totale eiwitgehalte. Bij hypoalbuminemie worden albumineconcentraties vermeld die lager zijn dan 20 g/L en een albumine:globuline-ratio lager dan 0,7 (Smets et al., 1999).

Microscopisch onderzoek

Voor parasitologisch onderzoek is de aanwezigheid van microscopisch of macroscopisch zichtbare larven in de feces de beste diagnostische parameter (Murphy et al., 1997).

Voor histopathologisch onderzoek kan een biopsie genomen worden van colon en cecum. Dit zou de meest sluitende diagnose van cyathostominose ante mortem kunnen geven, maar deze test wordt om economische en praktische redenen niet uitgevoerd (Murphy et al., 1997).

MATERIALEN EN METHODEN

Het voorliggende onderzoek is een retrospectieve studie naar de diagnostische parameters van wintercyathostominose. Alle gebruikte gegevens zijn afkomstig uit het archief van de kliniek Inwendige Ziekten van de Grote Huisdieren (Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent).

Studiepopulatie

In deze studie werd een mestonderzoek met een positief LPG-test (i.e. aantal larven per gram feces) bij paarden met diarree beschouwd als diagnostisch voor klinische wintercyathostominose. Tussen januari 2008 en januari 2018 werden 307 paarden aangeboden aan de universitaire dierenkliniek die voldeden aan de inclusiecriteria, namelijk paarden ouder dan drie maanden, die op de Faculteit Diergeneeskunde een mestonderzoek ondergingen en de klacht van diarree hadden. Diarree werd gekozen als een van de inclusiecriteria, omdat dit een vaak beschreven klinische parameter is die makkelijk door de dierenarts kan vastgesteld worden. In de literatuur zijn ook gevallen beschreven van larvale cyathostominose zonder het klinisch symptoom diarree (Murphy et al., 1997; Mair et al., 2000; Peregrine et al., 2005); de gegevens van paarden zonder diarree werden in deze studie niet opgenomen. Rekening houdend met de prepatente periode van de kleine strongyliden werden veulens jonger dan drie maanden niet in de studie opgenomen. Daar de studie gebaseerd is op een retrospectieve analyse werd de studiepopulatie door het gebrek aan bepaalde gegevens voor bepaalde parameters aanzienlijk verkleind.

Procedure

Elke patiënt die in de laatste tien jaar aangeboden werd aan de Faculteit Diergeneeskunde en voldeed aan de inclusiecriteria (zie hoger), werd opgenomen in deze studie. Per patiënt werden zowel de klinische parameters, de bloedwaarden, als de parasitologische parameters genoteerd. Met deze patiëntgegevens werden statistische verbanden gezocht tussen de afhankelijke parameter, i.e. diagnose van wintercyathostominose, en alle beschikbare onafhankelijke parameters. Alle significante onafhankelijke parameters geven dus een indicatie van de kans op een positief LPG-resultaat bij paarden met diarree.

Klinische parameters

De klinisch onafhankelijke variabelen van de geïnccludeerde paarden werden bepaald op de dag van aankomst. Als klinische variabelen werden leeftijd, ras, gewichtsverlies, subcutaan oedeem, temperatuur, ademhaling, pols, lethargie, zwakte, koliek-symptomen, eetlust, lendenreflex, echografie van het abdomen en mortaliteit in acht genomen. Bovendien werd ook steeds naar de ontwormingsgeschiedenis gevraagd en werd het seizoen waarin het paard werd aangeboden, genoteerd.

Bloedanalyse

Bij aanbidding op de dierenkliniek werd van ieder paard, ingesloten in de studie, bloed afgenomen. Niet elk paard had echter dezelfde bloedanalyse ondergaan,

waardoor voor bepaalde parameters niet alle paarden in acht genomen konden worden. Volgende hematologische en biochemische parameters werden voor de studiepopulatie genoteerd: hematocrietwaarde, leukocytengehalte, neutrofielenpercentage, “base excess”, pH, Pco₂ bicarbonaat, natrium, chloor, calcium, glucose, lactaat, totaal eiwit, serumalbumine, beta-globulinegehalte en albumine:globuline-ratio.

Mestonderzoek

Van alle paarden ingesloten in het onderzoek werd een fecesstaal genomen. Het aantal larven werd bepaald door één gram feces te wassen met leidingwater over een draadgaas van 38 µm. Daarna werd de inhoud van de zeef gekleurd met een jodium-oplossing en bekeken onder een stereomicroscoop (Smets et al., 1999). Tussen januari 2008 en januari 2018 ondergingen 307 paarden ouder dan drie maanden met diarree, een mestonderzoek.

Statistische analyse

Voor de statistische analyse werd het programma IBM® SPSS® Statistics versie 24.0 gebruikt. Met een multivariabel logistisch regressiemodel werd de associatie tussen de onafhankelijke variabelen vergeleken met de afhankelijke variabele. In deze studie werd een positieve LPG bij paarden met diarree als afhankelijke variabele beschouwd. Deze factor werd geassocieerd met de onafhankelijke variabelen om de aanwezigheid van wormen in de mest te voorspellen. In een eerste stap werden alle factoren univariabel getest. Alle factoren met een P-waarde < 0,20 werden behouden voor de volgende stap. Het finale, multivariabele model werd stapsgewijs retrograad opgebouwd, waarbij niet-significante factoren gradueel uitgesloten werden. Wanneer de P-waarde < 0,05 was, werd de associatie tussen de onafhankelijke parameter en een positief LPG als significant beschouwd. Correlaties tussen de factoren in de univariabele analyse werden uitgevoerd met behulp van de Pearson- en Spearman rho-correlatiecoëfficiënten. Categorische predictoren werden in groepen geplaatst volgens het aantal waarnemingen. Bij de continue predictoren werd een optimale “cut-off point” berekend. Dit punt werd bepaald via de “receiver operating characteristic” analyse (ROC-analyse) en met behulp van de Youden-index. Sensitiviteit en specificiteit werden berekend als parameters voor diagnostische accuraatheid.

Tot slot werd een tabel opgesteld om de diagnostische accuraatheid van het model te bepalen op basis van sensitiviteit, specificiteit en positief en negatief voorspellende waarden.

RESULTATEN

De combinatie van de onafhankelijke parameters geslacht, koorts, albumine, neutrofielenpercentage en seizoen is volgens het multivariabele logistische

Tabel 1. Weergave van de variabelen geslacht, koorts, albumine, neutrofielenpercentage en seizoen. In de onderstaande tabel worden de regressiecoëfficiënt (B), de standaarddeviatie (Stdev), de wald statistiek (Wald), de vrijheidsgraden (df), de P-waarde, de odds ratio (Exp (B)) en het betrouwbaarheidsinterval (CI) weergegeven. Het finale model is gebaseerd op 168 paarden.

	B	Stdev	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95% C.I.	
							Lower	Upper
Merrie			6,997	2	,030			
Hengst	-,955	,440	4,711	1	,030	,385	,162	,912
Ruin	-,942	,458	4,239	1	,040	,390	,159	,956
Koorts $\geq 38,2^{\circ}\text{C}$,689	,355	3,773	1	,052	1,992	,994	3,992
Albumine 20g/liter	1,078	,375	8,260	1	,004	2,939	1,409	6,132
Neutrofielenpercentage	,846	,371	5,209	1	,022	2,331	1,127	4,820
Seizoen: oktober - maart	,915	,435	4,418	1	,036	2,497	1,064	5,861
Doorlopend	-2,095	,529	15,699	1	,000	,123		

regressiemodel de beste combinatie om te voorspellen of een paard met diarree al dan niet positief zal testen voor LPG. Tabel 1 toont aan dat albumine de parameter is met de grootste significantie. Volgens de "odds ratio" is er ongeveer drie keer meer kans op een positieve LPG-test bij een albuminegehalte lager dan 20 g/L. Omdat de voorliggende studie een retrospectief onderzoek betreft, kon er enkel gebruik gemaakt worden van gegevens die gedurende de laatste tien jaar werden genoteerd. Door het gebrek aan bepaalde gegevens verkleint de studiepopulatie voor die parameters aanzienlijk. Hierdoor is het finale model gebaseerd op slechts 168 paarden, terwijl er 307 aan de inclusiecriteria voldeden. Van de 307 paarden waren overigens 119 LPG-testen positief.

In Tabel 2 worden de sensitiviteit, specificiteit, de positief en de negatief voorspellende waarde en de accuraatheid van het finale model weergegeven. De combinatie van deze vijf parameters heeft een specificiteit van 80,9%, maar de gevoeligheid is slechts 60,8%. De positief voorspellende waarde en de negatief voorspellende waarde zijn respectievelijk 71,4% en 72,4%, wat betekent dat een merrie met een albuminegehalte lager dan 20 g/L, een lichaamstemperatuur hoger dan 38,2°C, neutrofielenpercentages hoger dan 67% en aangeboden met diarree tussen de maanden oktober en maart 71,4% kans heeft op een positieve LPG-test, terwijl paarden met diarree die niet aan deze criteria voldoen, 72,4% kans hebben

op een negatief resultaat van het mestonderzoek. In 72,0% van de gevallen werden paarden op basis van het model aan de juiste categorie (al dan niet positief mestonderzoek) toegewezen. Deze accuraatheid werd bepaald door de verhouding tussen het aantal juist geklasseerde paarden en het totaal aantal geklasseerde paarden.

DISCUSSIE

In deze studie werd wintercyathostominose gedefinieerd als de combinatie van diarree en een positief fecesonderzoek (voor het aantonen van larven). Zoals eerder vermeld, kan wintercyathostominose ook voorkomen zonder diarree, maar paarden zonder diarree werden niet in de studie opgenomen. Anderzijds kunnen ook gezonde paarden larven van kleine strongyliden uitscheiden in de feces (Eysker et al., 1990). Om de kans op valspositieve resultaten te verkleinen, werd bewust gekozen voor een weinig gevoelige techniek voor het mestonderzoek, waarbij slechts één gram mest werd onderzocht.

Bij paarden met diarree moet cyathostominose gedifferentieerd worden van andere mogelijke oorzaken van diarree, zoals salmonellosis, NSAID-geïnduceerde colitis, intestinaal lymfosarcoma, "inflammatory bowel disease", *Lawsonia intracellularis*, *Clostridium*-infecties en andere oorzaken van acute enteritis. Er

Tabel 2. Sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief voorspellende waarde en accuraatheid van het finale model.

	Sensitiviteit (%)	Specificiteit (%)	PVW (%)	NVW (%)	Accuraatheid (% juist toegewezen)
Finaal model	60,8	80,9	71,4	72,4	72,0

PVW = positief voorspellende waarde. NVW = negatief voorspellende waarde.

worden ook gevallen beschreven van paarden die vermageren en lijden aan hypoproteïnemie zonder dat de dieren diarree vertonen. In dat geval moet cyathostominose gedifferentieerd worden van nierfalen, peritonitis, pleuritis, chronische aandoeningen en malnutritie (Peregrine et al., 2005). In dit onderzoek komen dezelfde diagnostische parameters naar voor als die die in de literatuur worden beschreven (Giles et al., 1985; Uhlinger, 1991; Love et al., 1999; Smets et al., 1999; Corning, 2009). De meerwaarde van dit onderzoek is dat er voor een combinatie van vijf significante parameters nu ook een voorspellende diagnostische waarde is toegekend.

Uit het finale model van deze studie blijkt dat de onafhankelijke parameters albumine, neutrofielenpercentage, seizoen, geslacht en koorts de beste parameters zijn om bij een paard aangeboden met diarree, de vermoedelijke diagnose van wintercyathostominose te stellen. Voorgaande parameters, met uitzondering van het geslacht, worden ook in de literatuur beschreven (Murphy et al., 1997; Love et al., 1999; Lyons et al., 2000; Peregrine et al., 2005).

Hypoalbuminemie is een parameter die in de literatuur herhaaldelijk terugkomt (Giles et al., 1985; Smets et al., 1999; Peregrine et al., 2005). In gevorderde gevallen worden ernstige dalingen van serumalbumine waargenomen, hoewel ook gevallen worden beschreven zonder daling. De cut-offwaarde van Giles et al. (1985) lag op $19,8 \pm 1,4$ g/L. Bij Smets et al. (1999) lag de cut-offwaarde voor serumalbumine bij met *Cyathostominae* geïnfecteerde paarden op 20 g/L. In de huidige studie was het albuminegehalte van 192 paarden gekend en lag de cut-offwaarde op 20 g/L. Na statistische analyse van de gegevens van het huidige onderzoek kwam albumine naar voor als de meest significante parameter in het finale model (Tabel 1). Er dient echter erkend te worden dat er slechts bij 192 van de 307 paarden, die aan de inclusiecriteria voldeden, serumalbumine werd getest. De parameter albumine is mogelijk onderhevig aan een selectiebias van de klinici, maar dit kon in deze retrospectieve studie niet achterhaald worden.

Neutrofilie bij paarden met larvale cyathostominose werd door verscheidene auteurs beschreven (Murphy en Love, 1996; Murphy et al., 1997; Lyons et al., 2000; Peregrine et al., 2005). In de huidige studie werd een cut-offwaarde gevonden voor een neutrofielenpercentage dat groter was dan 67%. Voor het absolute aantal neutrofielen lag de cut-offwaarde op $8,1 \cdot 10^9$ /liter. Een stijging van de witte bloedcellen wordt beschreven als bijkomende indicator voor klinische cyathostominose, maar kan niet in elk geval waargenomen worden (Giles et al., 1985; Uhlinger, 1991). Zowel een stijging van de neutrofielen als een stijging van de witte bloedcellen was in het huidige onderzoek significant voor klinische wintercyathostominose. Het leukocytenaantal werd niet in het finale model opgenomen omdat deze parameter geen meerwaarde gaf.

Hoewel klinische cyathostominose in elk seizoen

kan voorkomen (Love et al., 1999), worden de klinische symptomen veroorzaakt door larvale cyathostominose, in Europa vooral gezien in de late winter en de lente (Peregrine et al., 2005). Verschillende seizoensgebonden factoren kunnen een invloed hebben op het uitreden van de geëncysteerde larven. Er wordt verondersteld dat lichtperiodiciteit, het eten van nieuwe vegetatie en andere nog ongeïdentificeerde factoren een trigger kunnen zijn (Lyons et al., 2000). Ook in de huidige studie was het seizoen een significante parameter. Paarden met diarree aangeboden tussen de maanden oktober en maart, hadden significant meer kans op een positieve LPG-test. Deze parameter werd opgenomen in het finale model (Tabel 1).

In twee studies van Singh et al. (2012 en 2016) werd een hogere infectieprevalentie gevonden bij vrouwelijke paarden dan bij mannelijke paarden. In beide artikels waren de statistische verschillen niet significant (Singh et al., 2012; Singh et al., 2016). In dit onderzoek werd bij een significant hoger aantal vrouwelijke dieren een positief LPG waargenomen dan bij hengsten of ruïnen. Verder onderzoek is nodig om uit te maken of hier de samenstelling van de studiepopulatie of genetische verschillen aan de grondslag van deze bevinding liggen.

Koorts wordt herhaaldelijk beschreven in de literatuur (Murphy et al., 1997; Love et al., 1999; Corning, 2009). In de huidige studie werd de lichaamstemperatuur gezien als een categorische variabele koorts/geen koorts en werd de cut-offwaarde voor paarden met wintercyathostominose bepaald op $38,2^\circ\text{C}$. In deze studie was de onafhankelijke parameter koorts net niet significant, maar werd wel gebruikt in het finale model.

CONCLUSIE

Aan de hand van het finale model werden de vijf belangrijkste parameters omtrent de diagnostiek van larvale cyathostominose bepaald. Voor elk van deze parameters werd onder andere de significantie en de odds ratio bepaald. Zo bleek dat de parameter albumine het meest significant was en de grootste odds ratio had. De diagnostische accuraatheid van het finale model toont aan dat de combinatie van de parameters geslacht, koorts, hypoalbuminemie, een verhoogd neutrofielenpercentage en seizoen sterk indicatief is voor klinische wintercyathostominose (Tabel 2). Door de beperkte sensitiviteit van het finale model blijft het uitvoeren van een mestonderzoek bij het vermoeden van larvale cyathostominose echter noodzakelijk om de diagnose te bevestigen.

REFERENTIES

Corning, S., (2009). Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites & Vectors* 2 (Suppl 2), 1.

- Eysker, M., Boersema, J.H., Kooyman, F.N.J., (1990). Seasonally inhibited development of cyathostomine nematodes in Shetland ponies in the Netherlands. *Veterinary Parasitology* 36, 259-264.
- Gasser, R.B., Hung, G-C., Chilton, N.B., Beveridge, I., (2004). Advances in developing molecular-diagnostic tools for strongyloid nematodes of equids: fundamental and applied implications. *Molecular and Cellular Probes* 18, 3-16.
- Giles, C.J., Urquhart, K.A., Longstaffe, J.A., (1985). Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): A report of 15 clinical cases. *Equine Veterinary Journal* 17, 196-201.
- Kaplan, R.M., Nielsen, M.K., (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: it ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education* 22, 306-316.
- Love, S., Murphy, D., Mellor, D., (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology* 85, 113-122.
- Lyons, E.T., Drudge, J.H., Tolliver, S.C., (2000). Larval cyathostomiasis. In: Turner, A.S., Timoney P.J. (editors). *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. Elsevier, Lexington, Kentucky, USA, pp. 501-513.
- Mair, T.S., Sutton, D.G.M., Love, S., (2000). Caecocolic intussusception associated with larval cyathostomosis in four young horses. *Equine Veterinary Journal* 32, 77-80.
- Murphy, D., Love, S., (1997). The pathogenic effects of experimental cyathostome infections in ponies. *Veterinary Parasitology* 70, 99-110.
- Murphy, D., Keane, P., Chandler, K., Goulding, R., (1997). Cyathostome-associated disease in the horse: investigation and management of four cases. *Equine Veterinary Education* 9, 247-252.
- Peregrine, A.S., McEwen, B., Bienzle, D., Koch, T.G., Weese, J.S., (2005). Larval cyathostomiasis in horses in Ontario: An emerging disease? *Canadian Veterinary Journal* 46, 80-82.
- Proudman, C., Matthews, J., (2000). Control of intestinal parasites in horses. *In Practice* 20, 90-97.
- Reinemeyer CR., (1986). Observations on the population dynamics of five cyathostome nematode species of horses in northern USA. *Equine Veterinary Journal* 18, 121-124.
- Singh, G., Soodan, J.S., Singla, L.D., Khajuria, J.K., (2012). Epidemiological studies on gastrointestinal helminths in horses and mules. *Veterinary Practitioner* 13, 23-27.
- Singh, G., Singh, N.K., Singh, H., Rath, S.S., (2016). Assessment of risk factors associated with prevalence of strongyle infection in equines from Central Plain Zone, Punjab. *Journal of Parasitic Diseases* 40, 1381-1385.
- Smets, K., Shaw, D.J., Deprez, P., Verduyck, J., (1999). Diagnosis of larval cyathostomiasis in horses in Belgium. *Veterinary Record* 144, 665-668.
- Uhlinger, C.A., (1991). Equine small strongyles: epidemiology, pathology and control. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 13, 863-869.

Uit het verleden



Eigenaars van neerhoedieren komen 's Vrijdags met hun zieke beesten naar de kosteloze raadpleging. Prof dr. Geurden, omringd door studenten.

DE VLAAMSCHE VEEARTSENIJSCHOOL

over ziekten; heeft, anderzijds, het publiek het voordeel, te beschikken over 'n kostelozen dienst; worden sociale, economische en hygiënische belangen gediend. Voor de wetenschappelijke onderzoeken beschikt men er over een labora-

Wij hebben jou in 't oog. Jij ons?

www.mediaservice.be



© SHUTTERSTOCK 127745100133

Mediaservice  
gericht adverteren

Ocular manifestations and CT scan findings in a cat with suspected angioinvasive pulmonary neoplasia

Oculaire manifestaties en computertomografische bevindingen bij een kat met vermoedelijke angio-invasieve pulmonale neoplasie

L. Bataller-Montaner, R. Tapia-Nieto

North Downs Specialist Referrals; 3 & 4 The Brewerstreet Dairy Business Park, Brewer St, Bletchingley RH1 4QP, United Kingdom

laurabataller2@gmail.com

ABSTRACT

An eleven-year-old domestic long hair cat was presented with a history of stiffness of the hind limbs, lethargy, depression, partial anorexia and recent anisocoria. Ophthalmological examination revealed chorioretinal necrosis and angioinvasive pulmonary carcinoma was suspected. Computed tomography (CT) findings were consistent with the presumable diagnosis.

SAMENVATTING

Een elf jaar oude Europese langhaar werd aangeboden met een geschiedenis van stijfheid van de achterpoten, lethargie, depressie, partiële anorexie en recente anisocorie. Oftalmologisch onderzoek toonde chorioretinale necrose aan en angio-invasief longcarcinoom werd vermoed. De resultaten van het computertomografisch onderzoek bevestigden de vermoedelijke diagnose.

INTRODUCTION

Primary pulmonary neoplasia is relatively uncommon in cats and generally has a poor prognosis (Aarsvold et al., 2015). Because of the non-specific clinical signs, cats are often presented in a relatively advanced stage of the disease (Aarsvold et al., 2015). Cats may present with respiratory signs, weight loss, lethargy, lameness or may show no clinical signs (Aarsvold et al., 2015). According to the Veterinary World Health Organization, primary pulmonary neoplasia can be classified based on cell origin, cell morphology or anatomic location (Aarsvold et al., 2015). Pulmonary tumors are broadly classified as adenocarcinoma, adenosquamous carcinoma, squamous cell carcinoma or tumors of bronchial origin (Byers et al., 2006) and adenocarcinoma is the most frequently observed in cats, representing more than 50 % of reported cases of pulmonary tumors in cats (Aarsvold et al., 2015). In the cat, intraocular involvement of primary lung neoplasia (adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, hemangiosarcoma and fibrosarcoma) has been reported (Cassotis et al., 1999). The majority of the reported cases of intraocular metastasis in the

cat have posterior uveal involvement, either alone or in conjunction with the anterior uvea (Cassotis et al., 1999). Lesions associated with neoplastic metastasis to the choroid typically result from the growth of neoplastic cells within the ocular tissues and the physical presence of a subretinal mass or masses (Cassotis et al., 1999). Radiographic findings in cats with lung tumors are variable but may include a solitary pulmonary mass in the caudal lungs, pleural effusion and signs of tracheobronchial lymph node enlargement (Aarsvold et al., 2015). Further diagnostic work-up includes bronchoalveolar lavage or transtracheal aspirate, ultrasound-guided or fluoroscopy-guided fine-needle aspirate or surgical lung lobectomy. Computed tomography (CT) enables more accurate surgical planning and identification of metastasis presurgery (Aarsvold et al., 2015).

CASE DESCRIPTION

An eleven-year-old domestic long hair cat presented to North Downs Specialist Referrals (UK) as an emergency due to a history of stiffness of the hind

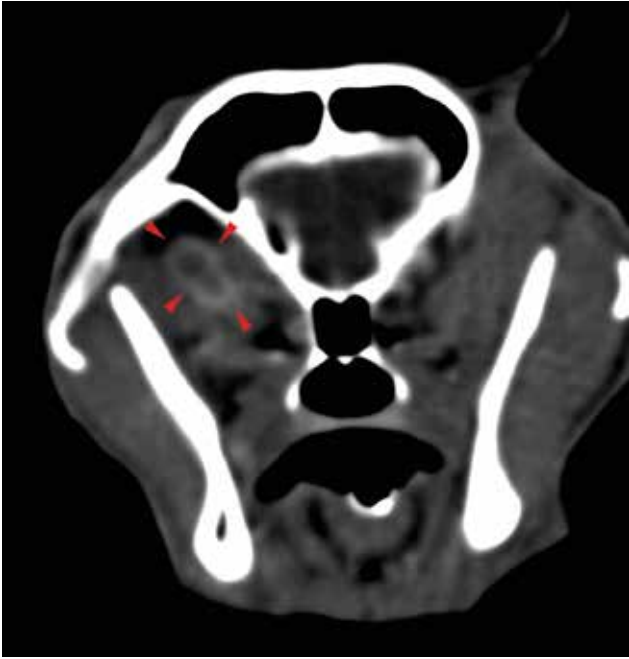


Figure 1. Rim contrast-enhancing lesion on the posterior compartment of the right eye.

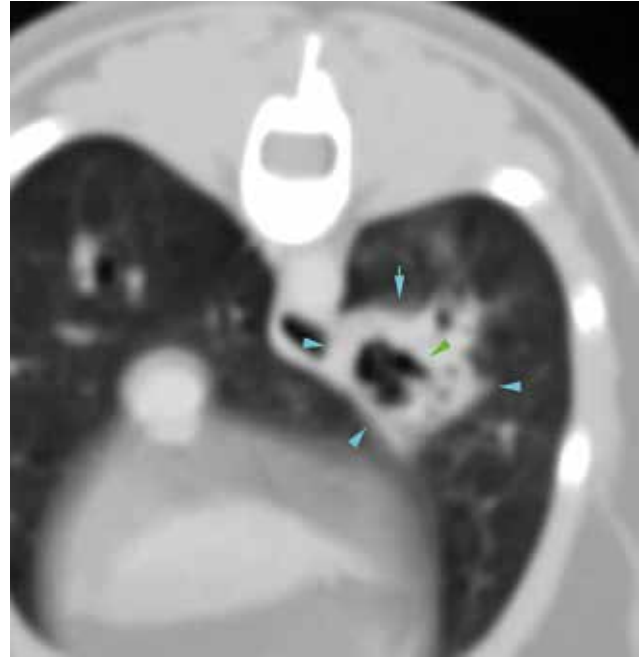


Figure 2. Large cavitary and bronchocentric soft tissue mass on the left caudal lung lobe.

limbs, lethargy and depression, partial anorexia and most recently anisocoria.

Three weeks prior to referral, stiffness of the hind limbs and reluctance to jump had been reported; otherwise, the patient was generally well with a slightly reduced appetite. Radiographs of the hips and stifles had been performed at the local veterinarian one week prior to referral, with unremarkable findings. A few days later, the cat was reluctant to move and had a crouched gait.

Upon presentation, physical examination revealed a grade III systolic murmur, the respiratory rate and effort were normal, and abdominal palpation was within normal limits. The cat was quiet but alert. The right eye had a fixed, dilated and non-responsive pupil.

Ophthalmological examination revealed menace response deficit in the right eye. Direct pupillary light reflex (PLR) was absent in the right eye but consensual reaction was present in the left. Direct PLR in the left eye was present and consensual reaction was present in the right eye. After sedation, retinal examination of the right eye was carried out and revealed a fully dilated pupil, smooth margins and the eye was poorly responsive. The lens and vitreous were unremarkable. There were multiple tan to black discolored regions throughout the entire fundus consistent with wedge-shaped foci of chorioretinal necrosis and moderate retinal vascular attenuation. Examination of the left eye was unremarkable.

The diagnostic plan included hematological and biochemical examinations that were unremarkable, except for mild neutrophilia. Abdominal radiographs showed a few small bilateral nephroliths but were otherwise normal. Computed tomography was elected

as a cross-sectional diagnostic tool to assess head, thorax and cranial abdomen (including liver and spleen) due to suspicion of neoplasia primary and/or metastatic following the ophthalmological examination findings. On the head, an elongated (10mm x 6mm) iso-attenuating lesion with a moderately thick outer rim of contrast-enhancement was found in the posterior segment of the right eye (Figure 1). On the thorax, a rounded, 20mm-cavitated, bronchocentric pulmonary lesion was found in the left caudal lung lobe. This lesion had a moderate peripheral enhancement after administration of contrast (Figure 2). A few small, faint, soft tissue attenuation parenchymal lesions were located on both caudal lung lobes. Moreover, multiple coalescing nodules were present in the dorsal tip of the left caudal lung lobe (Figure 3). The tracheobronchial lymph nodes were moderately enlarged. In addition, five rounded to ovoid soft tissue attenuating muscular lesions, ranging from 5 to 16mm in diameter were located in the paraspinal muscles adjacent to C1 and T5 vertebrae and in the supra- and infrascapular muscles. These muscular lesions were mostly cavitated and with moderate contrast enhancement (Figure 4). The combination of lesions in the lungs, muscle and post segment of the right eye were consistent with a widespread neoplastic process. Fine-needle aspirations of the muscular lesions were taken. In-house examination of the slides by an ECVIM-boarded diplomate in internal medicine showed abnormal, undifferentiated cells with moderate to marked anisocytosis and anisokaryosis consistent with a neoplastic process. Angioinvasive pulmonary carcinoma with metastasis to the eye and muscles was strongly suspected. Full cytological and histological examinations of the masses

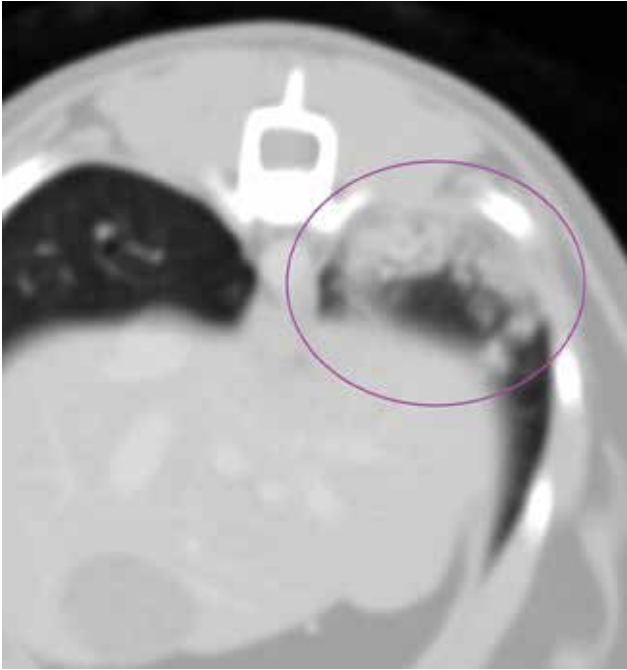


Figure 3. Large focal and sharply demarcated lesions in the dorsal aspect of the left caudal lung.

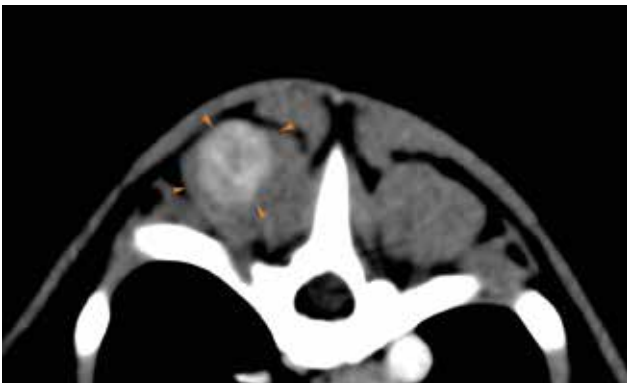


Figure 4. Rounded and heterogeneous nodular contrast-enhancing muscular lesion in the right epaxial muscle.

would have been appropriate to confirm the diagnosis. However, due to financial restraint, poor prognosis and the disseminated nature of the disease, euthanasia was elected. The owner declined post-mortem examination.

DISCUSSION

The most commonly reported ophthalmologic presentation for metastatic intraocular neoplasia to the eyes of cats is large retinal detachments and multifocal retinal hemorrhages (Cassotis et al., 1999). Comparatively, metastatic neoplasms to the choroid in humans manifest as serous retinal detachment, either as a solitary mass or as multiple creamy, yellow sub-retinal masses (Cassotis et al., 1999). In the present case, on CT examination, there was a lesion posterior

to the right eye, which was suspected to be associated with the physical presence of neoplastic cells or to be caused by a thrombi or emboli to the chorioretinal arteries. Moreover, infarction and secondary tapetal and sensory retinal necrosis were observed. On ophthalmoscopic examination, multiple tan to black discolored regions throughout the entire fundus consistent with wedge-shaped foci of chorioretinal necrosis and moderate retinal vascular attenuation were observed. Diagnostic differentials related to this finding included metastatic neoplasia (carcinoma), chorioretinitis due to systemic infectious disease, systemic hypertension, hyperviscosity syndrome, immune-mediated disease and viral infections, such as feline infectious peritonitis (FIP) and feline leukemia virus (FeLV) (Sandmeyer et al., 2009).

In a study describing four cases of confirmed angioinvasive pulmonary carcinoma, unilateral, wedge-shaped areas of chorioretinal degeneration most prominent in the tapetal fundus, were observed on ophthalmoscopic examination. The primary differential considerations in these cats were systemic hypertension, widespread chorioretinitis with secondary chorioretinal necrosis and lymphosarcoma (Cassotis et al., 1999). However, the absence of extensive serous exudation in the retina, and the fluorescein angiographic findings of chorioretinal non-perfusion to the tapetal fundus effectively ruled out these conditions (Cassotis et al., 1999). In this case, fluorescein angiographic examination was not performed, as the main suspicion based on presentation and history was angioinvasive pulmonary neoplasia, and therefore, a CT scan was elected as the main diagnostic tool.

A large focal, sharply demarcated lesion in the dorsal aspect of the lung lobe was strongly suspected to be the primary origin of a neoplasia, such as adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, adeno-squamous carcinoma or tumors of bronchial origin. Primary lung neoplasia is uncommon in the cat (Cassotis et al., 1999). A multicenter retrospective study revealed that 65 of 86 cats with primary lung tumors showed evidence of metastasis (Cassotis et al., 1999; Hahn and McEntee 1997). Of the extrathoracic metastases found, nine were muscular, one was in bone and none were reported in ocular structures (Cassotis et al., 1999; Hahn and McEntee 1997). In the present case, rounded, ovoid, contrast enhancing, muscular lesions at multiple musculoskeletal sites were present, strongly suggesting metastatic lesions. Differential diagnosis for these muscular lesions included most likely, neoplastic infiltration, such as metastasis or round cell tumor, or less likely, multifocal inflammatory/infectious myositis.

A few muscular lesions were sampled with fine-needle aspiration, and in-house examination of the muscular cells exhibited cytological characteristics of malignancy, anisocytosis and anisokaryosis. The combination of the ophthalmological, imaging and the cytological findings suggested that angioinvasive

pulmonary neoplasia was the most likely diagnosis. The major limitation to this case report was the lack of histopathological diagnosis.

In summary, cats with evidence of chorioretinal infarctive lesions should be suspected of metastasis from primary pulmonary neoplasia. CT angiography is a useful screening diagnostic tool for the detection of the primary neoplasia and metastasis, and helps in biopsy guidance and surgical planning. Inversely, cats with primary pulmonary neoplasia should routinely have an ophthalmoscopic examination to rule out vascular occlusion from metastasis. Ischemic chorioretinopathy associated with primary bronchogenic carcinoma appears to be a unique neoplastic syndrome in the cat.

Cassotis N.J., Dubielzig R.R., Gilger B.C., Davidson M.G., (1999). Angioinvasive pulmonary carcinoma with posterior segment metastasis in four cats. *Veterinary Ophthalmology* 2 (2), 125-131.

Hahn K.A., McEntee M.F., (1997). Primary lung tumors in cats: 86 cases (1979-94). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 211, 1257-1260.

Sandmeyer L.S., Cosford K., Grahn H.B., (2009). Metastatic carcinoma in a cat. *The Canadian Veterinary Journal* 50 (1), 96-96.

REFERENCES

Aarvold S., Reetz J.A., Reichle J.K., Jones I.D., Lamb C.R., Evola M.G. et al.(2015). Computed tomographic findings in 57 cats with primary pulmonary neoplasia. *Veterinary Radiology Ultrasound* 56,3, 272-277.

Byers, C. G., Tumulty, J. W., Stefanacci, J. D. (2006). What is your diagnosis? *Journal of the American Veterinary Medical Association* 228(9), 1341-1342.

MIJNDIEREN.EU
Hét communicatiekanaal tussen de praktijk en haar klanten

LEVERANCIERS
Plaats bestellingen binnen Fuga, en je nieuwe leveringen worden automatisch ingelezen

LABO'S
Fuga leest je laboresultaten in en koppelt ze automatisch aan de juiste context

BOEKHOUEXPORT
Fuga wisselt de nodige gegevens uit met je boekhoudpakket naar wens

SYMPHONY
Symphony zet je digitale beelden meteen in het juiste dossier

INTEGRATIES
Verstuur sms'en en kaartjes en synchroniseer je Fuga-agenda met een externe kalender

ANTIBIOTICAREGISTRATIES
Stuur rechtstreeks je antibioticagebruik door naar Sanitel-Med, AB Register, MediRund en Bigame

VERZEKERINGEN
Mogelijkheid om dieren makkelijk te verzekeren

FUGA

Fuga is marktleider in online software voor het beheer van de dierenartsenpraktijk.

Interesse in een **demo**?
+32 493 30 98 19 of fuga@sonetas.eu
www.fuga.eu

130107M 03325

Therapeutic complications and follow-up in a dog with atopic dermatitis

Therapeutische complicaties en opvolging bij een hond met atopische dermatitis

C. Meere, S. Vandenabeele

Small Animal Department,
Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

S.Vandenabeele@ugent.be

A BSTRACT

In this case report, the therapeutic follow-up of a four-year-old, male, castrated Shih Tzu with atopic dermatitis is described. The treatment first consisted of prednisolone (Prednisolone®), followed by oclacitinib (Apoquel®) and afterwards lokivetmab (Cytopoint®). Furthermore, the diagnosis of AD and the different treatment options are discussed. In addition, more information is given about lokivetmab (Cytopoint®), a new therapeutic agent.

SAMENVATTING

In deze casereport wordt de therapeutische opvolging van een vier jaar oude, mannelijke, gecastreerde shih tzu met atopische dermatitis (AD) beschreven. De hond werd behandeld met prednisolone (Prednisolone®), vervolgens met oclacitinib (Apoquel®) en daarna met lokivetmab (Cytopoint®). In de discussie worden de diagnostische aanpak en de verschillende types van behandeling kritisch besproken. Verder wordt ingegaan op de recente therapie met lokivetmab (Cytopoint®).

INTRODUCTION

Canine atopic dermatitis (AD) has been recognized for a long time. In 1941, the first detailed case report of 'spontaneous allergy', i.e. atopy in a dog with conjunctivitis, urticaria and rhinitis was published. An allergic sensitization to ragweed pollen and a response to allergen-specific immunotherapy (ASIT) were observed (Wittisch, 1941). AD can be defined as a genetically predisposed, commonly seen, pruritic and inflammatory skin disease. In most cases, IgE antibodies are produced to environmental allergens and typical clinical features are seen (Halliwell, 2006). Initially, non-lesional pruritus is seen (Favrot et al., 2010). These symptoms can be seasonal or non-seasonal depending on the type of allergen. Most plant-based, environmental allergens give seasonal pruritus, whereas house dust mites give non-seasonal pruritus (Zur et al., 2002). Primary skin lesions, such as erythema and macular papular rash, are seen on specific body areas, i. e. face, concave aspect of the ear pinnae, ventrally, axillae, inguinal area, distal extremities (Griffin and DeBoer, 2001) (Figure 1). Chronic atopic dermatitis can give secondary skin lesions due to secondary infections, self-trauma and chronic inflammation (Griffin and DeBoer, 2001).

Up to 10% of the dogs worldwide suffer from AD, and therefore, practical guidelines are important to diagnose the disease properly (Scott et al., 2001; Lund et al., 2009). Certain breeds are more predisposed to AD than others suggesting a genetically mediated, familial condition (Nutall et al., 2013). Breed prevalence can vary between geographical areas, and mixed-breed dogs have a lower expected prevalence. (Zur et al., 2002).

In 2015, a set of practical guidelines was published to diagnose AD by a subgroup of the International Committee for Allergic Animals (ICADA). First, other skin conditions with identical or resembling clinical features need to be ruled out. Important differential diagnoses are ectoparasites (*Fleas*, *Scabies*, *Demodicosis*, *Cheyletiellose*, *Pediculosis*, *Otocariasis*, *Trombiculiasis* and *Nasal mites*), microbial skin infections (*Staphylococcal pyoderma*, *Malassezia dermatitis*), other allergic skin diseases (flea allergy dermatitis, food intolerance/allergy, insect bite hypersensitivity, contact dermatitis) and neoplastic skin disease (cutaneous lymphoma). They need to be excluded based on the history, dermatologic examination and diagnostic tests (skin scraping, hair plucking, cytological examination of the skin and ear samples) and the response to treatment. To exclude a cutaneous

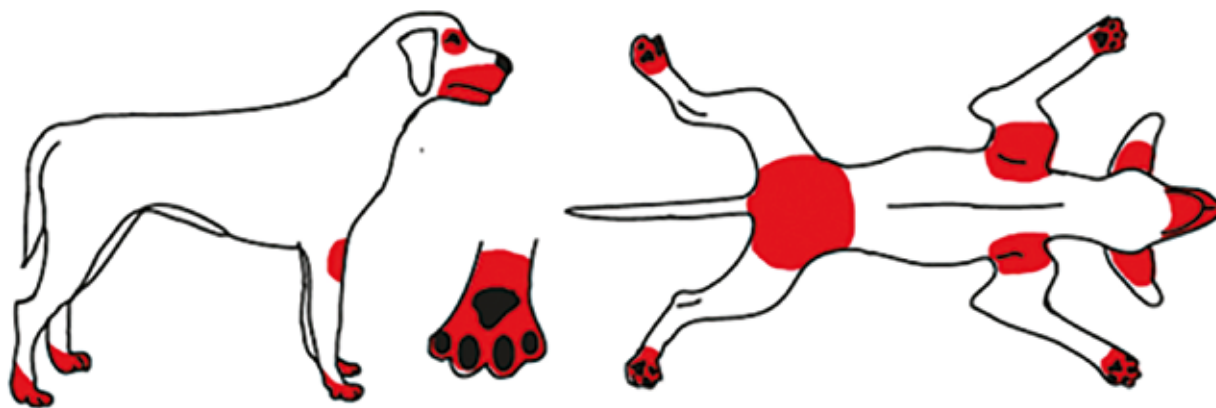


Figure 1. Atopic dermatitis distribution (Griffin and DeBoer, 2001).

adverse food reaction (CAFR), an elimination diet trial is required (Hensel et al., 2015). Secondly, Favrot et al. (2010) created ‘Favrot’s clinical criteria sets’ to help with the detailed interpretation of the historical and clinical features of the patient (Table 1). Finally, once the clinical diagnosis has been made, an allergy test can be performed to identify potential causative allergens for allergen-specific immunotherapy (ASIT) (Hensel et al., 2015).

The therapeutic strategy should focus on AD and complicating skin conditions that may contribute to the cutaneous inflammation and pruritus. Fleas, the most common ectoparasites, are a confounding factor, which provoke pruritus as well. Preventive measurements need to be taken to exclude them. Yeast and bacterial infections are often simultaneously present with AD and also need to be treated. Initially, system-

ic and/or topical treatment should be started, followed by preventive topical treatment measurements. Afterwards, CAFR should also be excluded or diagnosed before the specific treatment of AD can be started. Treatment of AD can be divided into symptomatic and etiologic. Symptomatic treatment includes glucocorticoids (systemically or topically), oclacitinib, ciclosporin and lokivetmab. The etiologic treatment includes allergen avoidance and/or ASIT (Olivry et al., 2010; Saridomichelakis and Olivry, 2016).

CASE REPORT

On day 0, a four-year-old, male, castrated Shih Tzu was presented at the Dermatology Department of the Small Animal Department of Ghent University with

Table 1. Favrot’s clinical criteria sets (Favrot et al., 2010).

	Use	Reliability
Set 1:	<ul style="list-style-type: none"> • Use for clinical studies and adapted required criteria based on the goal of the study • If higher specificity is required, 6 criteria should be fulfilled (e.g., drug trials with potential side effects) • If higher sensitivity is required, 5 criteria should be fulfilled (e.g. epidemiological studies) 	<ul style="list-style-type: none"> • 5 criteria:
1. Age at onset < 3 years		Sens. 85.4/
2. Mostly infor		Spec. 79.1%
3. Corticosteroid-responsive pruritus		
4. Chronic or recurrent yeast infections		• 6 criteria:
5. Affected front feet		Sens. 58.2%
6. Affected ear pinnae		Spec. 88.5%
7. Non-affected ear margins		
8. Non-affected dorso-lumbar area		
Set 2:	<ul style="list-style-type: none"> • Use to evaluate the probability of the diagnosis of canine AD • 5 criteria should be fulfilled • Do not use alone for diagnosis of canine AD, and rule out resembling diseases 	<ul style="list-style-type: none"> >• 5 criteria:
1. Age at onset < 3 years		Sens. 77.2%
2. Mostly indoor		Spec. 83%
3. “Alesional” pruritus at onset		• 6 criteria:
4. Affected front feet		Sens. 42%
5. Affected ear pinnae		Sens. 93.7%
6. Non-affected ear margins		
7. Non-affected dorso-lumber area		

the complaint of non-steroid responsive atopic dermatitis (pruritus score 10/10). The dog had a chronic history of non-seasonal waxing-and-waning pruritus since the age of two. The pruritus had always been well-controlled with a daily 0.33 mg/kg prednisolone administration. Approximately two months ago, the dog underwent surgical closure of a portosystemic shunt with an ameroid constrictor, and therefore, the dog was still receiving a liver diet (Hill's L/D®, Hill's Pet products, Brussels, Belgium). Since the surgery, the AD was less controlled, and therefore, the dosage of the prednisolone treatment was increased from 0.33 mg/kg daily to alternating 0.5 and 0.33 mg/kg daily. The dog needed a daily therapy with prednisolone to control the AD. Dermatological examination revealed erythematous skin ventrally, scales and greasiness on the dorsum. The differential diagnosis for these symptoms included ectoparasites, microbial skin infections and uncontrolled allergic skin disease. Further diagnostic tests were performed: a tapestrip colored with methylene blue revealed massive *Malassezia* dermatitis on the abdomen and a trichogram from the scaly dorsal skin revealed the presence of numerous demodex mites. The demodicosis was treated with oral afoxolaner (Nexgard, Merial, Toulouse, France) according to the instructions of the manufacturer. The *Malassezia* dermatitis was treated with shampoo containing chlorhexidinegluconate and miconazolnitate (Malaseb, Dechra Veterinary Products A/S, Uldum, Denmark) three times a week, and the AD was treated with the same dose of prednisolone. A re-examination within four weeks was planned to check if the dosage of the prednisolone could be decreased by then.

On day 26, the dog was presented again at the Dermatology Department for recheck. The pruritus was well-controlled and dermatological examination revealed a strongly decreased *Malassezia* infection and well-controlled demodicosis. It was advised to decrease the use of the shampoo to once a week, to continue afoxolaner once a month and change from prednisolone to oral oclacitinib (Apoquel, Zoetis, Zaventem, Belgium,) at 0.5 mg/kg twice daily for fourteen days and then once daily.

On day 43, the dog was presented again at the Dermatology Department for recheck. The pruritus showed a slight increase (pruritus score 7/10), the prescribed use of shampoo was reduced to once a month instead of once a week and afoxolaner was still to be administered monthly. Furthermore, the dog showed signs of lower urinary tract disease (hematuria, strangury and dysuria). The local veterinarian sent urine taken by cystocentesis for culture to the laboratory and diagnosed bacterial cystitis sensible to amoxicillin-clavulanate. Therefore, the dog was treated with oral amoxicillin-clavulanate (Clavaseptin, Vétoquinol, 's Hertogenbosch, the Netherlands) at 12.5 mg/kg twice daily for fourteen days and oral meloxicam (Metacam, Boehringer, Brussels, Belgium,) at 0.1 mg/kg once daily for ten days. Dermatological examination revealed erythema at the lips, ventral neck, axillae

and at the right inguinal area. Interdigital examination revealed erythema, hyperpigmentation, scaling and a bad odor. The ears also had a bad smell. Bilateral erythema and scales were present at the pinna. A tape strip colored with methylene blue from the interdigital area revealed large numbers of *Malassezia* organisms. *Malassezia* was also present on cytologic ear samples with three organisms/high power field (hpf). The *Malassezia* pododermatitis remained despite of the topical treatment with the shampoo; therefore, oral treatment was started with ketoconazole (Ketofungol, Eli Lilly, Brussels, Belgium) at 6.67 mg/kg once daily for 24 days. The demodicosis was well-controlled, and therefore, the administration of afoxolaner was stopped. The bilateral *Malassezia* otitis was treated locally with ear medication containing orbifloxacin, mometasone furoate and posaconazole (Posatex, Intervet International, Boxmeer, the Netherlands) once daily, and also oclacitinib was maintained once daily.

On day 78, the dog was presented again at the Dermatology Department for re-examination. The pruritus was well-controlled. For one week, the ketoconazole administration was stopped; at that time, the dog still received the prescribed ear medication. The patient again showed signs of lower urinary tract disease (hematuria, strangury and dysuria). Again, urine examination was performed after cystocentesis and an active sediment was seen. Again, the urine was sent for culture and revealed an infection with *E. coli*, which was responsive to amoxicillin clavulanate. Abdominal ultrasound of the bladder was unremarkable. Treatment of the cystitis was repeated. On dermatological examination, the *Malassezia* dermatitis infection and demodicosis were well-controlled. The advice of the Dermatology Department was to continue only oclacitinib, but to stop the medication if the bacterial cystitis would relapse. In that case, ciclosporin (Cyclavance, Virbac, Carros, France) at 5 mg/kg once daily would be a potential replacement therapy for oclacitinib.

On day 141, the dog was presented again at the Dermatology Department for re-examination. Again, the pruritus had increased (pruritus score 7/10) and was localized at the feet, inguinal area and ventrum. The dog still showed symptoms of lower urinary tract disease (hematuria, strangury and dysuria) and was presented to the local veterinarian for this problem. Therapy was changed to nitrofurantoin (Nitrofurantoin, MC Mylan, Bunschoten, the Netherlands) at 4 mg/kg three times daily for fourteen days and meloxicam (Metacam, Boehringer, Germany) at the same dosage for ten days. It was unclear if urine analysis had been performed. Moreover, the dog's diet had changed to Hill's C/D® (and the pruritus score had already increased before the change of diet). On dermatological examination, erythematous skin was present at both ears, thorax, axillae and the inguinal area. On the flank, some crusts were observed. The colored tape strip revealed cocci on the interdigital area and fagocyted cocci on the skin. The dermatologic diag-

nosis was bacterial pyoderma. The advice of the Dermatology Department was to use fusidic acid and betamethasone gel (Isaderm, Dechra, Uldum, Denmark) twice daily, prednisolone (Prednisolone, Kela, Hoogstraten, Belgium) at 0.66 mg/kg once daily for fourteen days and to continue the oclacitinib administration. A subcutaneous injection every thirty days of lokivetmab (Cytopoint, Zoetis, Louvain-la-Neuve, Belgium) at 1 mg/kg, another treatment for atopic dermatitis, was to consider for the next check-up.

On day 181, the dog was presented again at the Dermatology Department for a first injection with lokivetmab. The pruritus was decreased (pruritus score 6/10). According to the owner, the dog urinated less. The diet still included Hill's C/D® and Hill's I/D low fat® as a treat. On dermatological examination, erythema was seen at the axillae, medial side of the front paws, inguinal area and interdigitally. *Malassezia* was present on cytologic examination of the feet (6/HPF). The advice of the Dermatology Department was to treat the AD with lokivetmab instead of oclacitinib and the *Malassezia* pododermatitis with shampoo (chlorhexidinegluconate and miconazolnitate and ketoconazole) three times a week and ketoconazole (Ketofungol, Eli Lilly, Brussels, Belgium) at 6.67 mg/kg once daily for 24 days.

On day 208, the dog was re-presented at the Dermatology Department. There were no signs of cystitis and therefore, urine analysis was not performed. Three weeks after the first injection, the pruritus returned at the paws. The dog's diet remained the same. On dermatological examination, the erythematous skin was not present anymore, but saliva staining of the hairs was still present on the cranial axillae and feet. The advice of the Dermatology Department was to treat the AD with a second injection of lokivetmab. With the lokivetmab injections, the pruritus was well-controlled. Moreover, it was advised to continue the ketoconazole administration during the weekends to treat the *Malassezia* pododermatitis.

On day 236, the dog was presented again at the Dermatology Department for. The pruritus had significantly decreased (pruritus score 1-2/10). Urinating was normal. On dermatological examination, no abnormalities were seen. The advice of the Dermatology Department was to give the third lokivetmab injection to treat the AD and to repeat the injection in five weeks. To treat the *Malassezia* pododermatitis, the advice was to continue the ketoconazole administration in the weekend. From then on, the local veterinarian could give the injections monthly.

DISCUSSION

In this case report, the diagnosis of AD was based on the history, clinical features and the positive reaction to glucocorticoids. As stated in the introduction, the diagnosis is made by exclusion of other skin conditions with identical or resembling clinical features.

Normally, clinical features start under three years of age and in indoor dogs (Favrot et al., 2010). This dog was a pure bred Shih Tzu, living indoors, and the pruritus started around the age of three. The exact onset of the pruritus was not known since the dog was presented at the Dermatology Department for the first time at the age of four. Normally, the pruritus is glucocorticoid responsive (Favrot et al., 2010). However, the dog in this case report was presented with non-steroid responsive atopic dermatitis. The prednisolone treatment had been successful in the past, but at the first consultation at the Dermatology Department, the dog was also suffering from concomitant *Malassezia* dermatitis and demodicosis. These infections were responsible for the shift from glucocorticoid responsive to non-steroid responsive AD (pruritus score 10/10).

Bowden et al. (2018) reported the presence of AD as a concomitant disease for dogs with demodicosis. Furthermore, they suggested that the Shih Tzu breed might be predisposed to develop demodicosis as well as *Malassezia* dermatitis (Bajwa, 2017).

The *Malassezia* dermatitis in the dog of the present case was initially treated three times a week with a shampoo containing chlorhexidinegluconate and miconazolnitate (Malaseb, Dechra Veterinary Products A/S, Uldum, Denmark). At that point in time, systemic use of ketoconazole was not a good option to treat the *Malassezia* dermatitis, because the dog had recently undergone surgery for an extra hepatic portosystemic shunt (EHPSS). Hepatic injury due to ketoconazole has been known for a long time (Lewis et al., 1984) and severe liver injury due to ketoconazole has been reported (Greenblatt and Greenblatt, 2014).

It is difficult to determine the actual prevalence of liver injury during the clinical use of ketoconazole as an antifungal agent. In this case report, the *Malassezia* dermatitis could not be controlled with the shampoo, and therefore, the therapy was changed to systemic treatment with ketoconazole. Since the EHPSS was closed, this therapy was a good option. In the literature, it has not been described which type of treatment (shampoo or systemic treatment) is the best to use to treat *Malassezia* dermatitis. Negre et al. (2009) recommended both the use of the shampoo (chlorhexidinegluconate 2% and miconazolnitate 2%; twice a week for three weeks) and systemic treatment (ketoconazole 10 mg/kg and itraconazole 5 mg/kg a day for three weeks) for *Malassezia* dermatitis. The systemic treatment with ketoconazole during the weekend was given to decrease the risk of recurrence of the *Malassezia* dermatitis. In this case, a dose of 6.7 mg/kg of ketoconazole was administered to the dog. In a study by Bensignor (2009), there was no significant difference between 5 and 10 mg kg⁻¹ day⁻¹ of ketoconazole administered once daily for three weeks (Negre et al., 2009); with a history of a portosystemic shunt, the lower dosage regimen was chosen in the patient of that study (Bensignor, 2009).

Diagnostic tests to exclude or diagnose CAFR were not performed. On the other hand, the dog of

the present case had no gastro-intestinal symptoms, nor did it show progressive pruritus, which made the presence of CAFR less likely (Hensel et al., 2015). Another important factor was the EHPSS, for which the dog needed a liver diet. Therefore, an elimination diet was not performed in this dog. Atopic dermatitis with food allergens as flare factors can thus not be completely excluded, but given the fact that the pruritus and infections in the dog of the present case were well-controlled with the monthly lokivetmab injections, a food allergy component was considered unlikely; hence, further work-up was not pursued.

For therapy optimization, the dog was frequently presented at the Dermatology Department. Dogs with AD need to be followed up at regular intervals, and a multimodal approach is usually beneficial to optimize treatment results with minimal side effects (Olivry et al., 2010; Saridomichelakis and Olivry, 2016).

Glucocorticoids were the first type of medication used to treat the AD in this case report. Prednisolone (0.33 mg/kg daily) had already been administered at the first consultation and the dose was increased to alternating 0.5 and 0.33 mg/kg daily. According to Olivry et al. (2015), a dosage of 0.25 – 0.50 mg/kg every other day corresponds to a normal maintenance dose in most of the AD patients. In this case report, the daily dosage of prednisolone was considered inappropriate for long-term therapy of atopic dermatitis. Due to the long-term use of prednisolone, the dog developed demodicosis and potentially, *Malassezia* dermatitis. However, the *Malassezia* dermatitis might also have been (part of) the primary flare factor of the AD, since this organism can act as an allergen for AD. Other side effects of prednisolone, such as polyuria, polydipsia, polyphagia, behavior changes, lethargy, vomiting, panting, diarrhea and hepatotoxic side effects, were not present in this dog (Olivry et al., 2015).

Although daily treatment with prednisolone leads to unwanted side effects, in the present case, it was necessary to control the allergic pruritus. Once the skin infections were treated, prednisolone was replaced by oclacitinib at the prescribed dose of one tablet of 3.6 mg once a day. The skin infection remained well-controlled, but a recurrent bacterial cystitis occurred. Cystitis has been described as a side effect of oclacitinib in more than 1% of the dogs after sixteen days of therapy (Cosgrove et al., 2015). Oclacitinib is a Janus Kinase inhibitor (JAK), possibly inhibiting other cytokines than the pro-inflammatory cytokines for pruritus/allergic reactions. Urinary tract infection/cystitis, vomiting, otitis, pyoderma and diarrhea are the most frequently reported side effects (Cosgrove et al., 2015).

Because of the recurrent bacterial cystitis in this case report, oclacitinib was changed to lokivetmab, and shortly thereafter, the bacterial cystitis was well-controlled and did not recur. Ciclosporin was also suggested as a potential replacement therapy, but long-term use of ciclosporin (Peterson et al., 2012) (and

glucocorticoids (Torres et al., 2005)) may also cause an increased risk for developing a urine tract infection (UTI). Therefore, it is recommended to perform a bacterial urine culture in dogs with pruritic disorders who receive long-term ciclosporin at least yearly (Peterson et al., 2012) or glucocorticoids (Torres et al., 2005). The incidence of subclinical bacteriuria in these dogs is respectively 8-30% and 18-39% (Torres et al., 2005; Peterson et al., 2012). On the other hand, Simpson et al. (2017) have recently described that oclacitinib does not lead to bacteriuria in dogs without a previous history of UTI or in dogs without other predisposing conditions for UTI. In contrast to glucocorticoids and ciclosporin, a bacterial urine culture at regular intervals is not recommended for dogs without clinical signs of UTI or abnormal urinalysis.

Lokivetmab contains a specific caninized monoclonal antibody against interleukin-31 (IL-31) and inhibits the IL-31 mediated signal transduction pathway that is part of the pathogenesis of atopic dermatitis. In AD skin, T helper 2 (T_H2)-deviated immune reactions occur and IL-31 is produced by the T_H2 cells (Furie et al., 2017). IL-31 is therefore seen as a pruritogenic cytokine (Gonzales et al., 2013; Furie et al., 2017). Due to the specific mode of action of lokivetmab, side effects are very rare; also hypersensitivity reactions are very rare. Lokivetmab is a safe product to use among AD dogs (Michels et al., 2016b; Moyaert et al., 2017). Michels et al. (2016b) found no immediate hypersensitivity reactions and only a very small percentage (2.5%) of treatment-induced immuno-genicity has been described. The dog in this case report received lokivetmab at the prescribed dose (1 mg/kg) and (approximately) frequency (30 days) (Moyaert et al., 2017). The dog was comfortable with this therapy (pruritus score of 1-2/10). Very mild pruritus (itching score 1-2/10) started approximately two to three weeks after the administration of the injections. Actually, it has been described that lokivetmab (0.5 and 2.0 mg/kg) reduces pruritus for at least one month. However, patients who are treated with higher doses of lokivetmab may respond at a higher level and for a longer period (Michels et al., 2016a). Furthermore, after a minimum dose of 1 mg/kg, the product has a quick onset of action (within one day) (Moyaert et al., 2017).

The dog in this case report was treated only symptomatically. Allergen avoidance is very difficult and often, it is impossible to eliminate all allergens. On the other hand, a reduction of some allergens may be beneficial to reduce the required amount of symptomatic treatment (Scott et al., 2001). For ASIT, patient-specific allergens are injected to reduce the clinical signs of AD (Keppel et al., 2008). The main drawbacks of this treatment are the success rate, the time period before the effect can be assessed and the costs. ASIT has a success rate (50% improvement in clinical signs) of 60 to 70% (DeBoer, 2017) and it should be administered at least six months before the effect

can be assessed. The costs are relatively high compared to the classic symptomatic treatment with prednisolone (Saridomichelakis and Olivry, 2016). On the other hand, ASIT therapy is safe to use for a long-term period (Kovse et al., 2012), and etiologic treatment has the potential to influence the course of the disease. When positive results are obtained, generally, lifelong treatment will be necessary (Griffin and Hillier, 2001).

The dog in this case report was treated symptomatically and finally, with lokivetmab, a good control of the AD was achieved. Another option would have been a combination of lokivetmab and ASIT. Symptomatic and etiologic treatments of AD can be combined and the use of both can be beneficial.

CONCLUSION

In this case report, the different ways to treat AD are discussed with the therapeutic advantages and disadvantages. A dog is described with AD, which was first steroid responsive but became non-steroid responsive due to *Malassezia* dermatitis and demodicosis. The therapy was changed from prednisolone to oclacitinib; however, this therapy could not prevent recurrence of cystitis. Finally, the therapy was changed to lokivetmab with good results. The AD was well-controlled without any side effects.

In conclusion, there is no superior therapy for AD, because the therapy is case-dependent and therefore, every patient should have its own work-up. Furthermore, follow-up is important to diagnose problems in an early stage and to keep the level of pruritus low. Lokivetmab, a new product, induces very few side effects and gives good therapeutic results.

REFERENCES

- Bajwa J. (2017). Canine *Malassezia* dermatitis. *The Canadian Veterinary Journal* 58, 1119-1121.
- Bensignor E. (2001). An open trial to compare two dosages of ketoconazole in the treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs. *Annales de Médecine Vétérinaire* 145, 311-315.
- Blaskovic M., Rosenkrantz W., Neuber A., Sauter-Louis C., Mueller R.S. (2014). The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *The Veterinary Journal* 199, 19-43.
- Bowden D.G., Outerbridge C.A., Kissel M.B., Baron J.N., White S.D. (2018). Canine demodicosis: a retrospective study of a veterinary hospital population in California, USA (2000-2016). *Veterinary Dermatology* 29, 19-29.
- Cosgrove S.B., Cleaver D.M., King V.L., Gilmer A.R., Daniels A.E., Wren J.A., Stegemann M.R. (2015). Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. *Veterinary Dermatology* 26, 171-179.
- DeBoer D.J. (2017). The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis: a review. *Veterinary Dermatology* 28, 25-31.
- Favrot C., Stefan J., Seewald W., Picco F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology* 21, 23-30.
- Furue M., Yamamura K., Kido-Nakahara M., Nakahara T., Fukui Y. (2017). Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy* 73 (1), 29-36.
- Gonzales A.J., Humphrey W.R., Messamore J.E., Fleck T.J., Fici G.J., Shelly J.A., Teel J.F., Bammert G.F., Dunham S.A., Fuller T.E., McCall R.B. (2013). Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 24, 48-53.
- Greenblatt H.K., Greenblatt D.J. (2014). Liver injury associated with ketoconazole: Review of the Published Evidence. *The Journal of Clinical Pharmacology* 54 (12), 1321-1329.
- Griffin C.E., DeBoer D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81(3-4), 255-269.
- Griffin C.E., Hillier A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): Clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81, 255-269.
- Halliwell R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114(3-4) 207-208.
- Hensel P., Santoro D., Favrot C., Hill P., Griffin C. (2015). Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research* 11, 196-209.
- Keppel K.E., Campbell K.L., Zuckermann F.A., Greeley E.A., Schaffler D.J., Husmann R.J. (2008). Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123, 337-344.
- Kovse M., Zrimsek P., Kotnik T. (2012). Evaluation of the effect of allergen-specific immunotherapy in atopic dogs using the CADESI-03 scoring system: a methylprednisolone controlled clinical study. *Veterinarski Arhiv* 82 (2), 251-264.
- Lewis J.H., Zimmerman H.J., Benson G.D., Ishak K.G. (1984). Hepatic injury associated with ketoconazole therapy. Analysis of 33 cases. *Gastroenterology* 86 (3), 503-513.
- Lund E.M., Armstrong P.J., Kirk C.A., Kolar L.M., Klausner J.S. (1999). Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214, 1336-1341.
- Marsella R., Olivry T., Carlotti D.N. (2011). Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 22, 239-248.
- Michels G.M., Ramsey D.S., Walsh K.F., Martinon O.M., Mahabir S.P., Hoevers J.D., Walters R.R., Dunham S.A. (2016a). A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab (ZTS-00103289), a canonized, anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 27(6), 478-485.
- Michels G.M., Walsh K.F., Kryda K.A., Mahabir S.P., Walters R.R., Hoevers J.D., Martinon O.M. (2016b). A blind-

- ed, randomized, placebo-controlled trial of the safety of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 28 (6), 505-515.
- Moyaert H., Van Brussel L., Borowski S., Escalada M., Mahabir S.P., Walters R.R., Stegemann M.R. (2017). A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 28 (6), 593-597.
- Negre A., Bensignor E., Guillot J. (2009). Evidence-based veterinary dermatology: a systemic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology* 20, 1-12.
- Nuttall T.J., Halliwell R.E.W. (2001). Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 12, 327-332.
- Nuttall T.J., Uri M., Halliwell R. (2013). Canine atopic dermatitis – what have we learned? *Veterinary Record* 23, 201-207. 247-251.
- Olivry T., Deboer D.J., Favrot C., Jackson H.A., Mueller R.S., Nuttall T., Prélaud P. (2010). Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology* 21, 233-248.
- Olivry T., Deboer D.J., Favrot C., Jackson H.A., Mueller R.S., Nuttall T., Prélaud P. (2015). Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *Veterinary Research* 11, 1-15.
- Peterson A.L., Torres S.M.F., Rendahl A., Koch S.N. (2012). Frequency of urinary tract infection in dogs with inflammatory skin disorders treated with ciclosporin alone or in combination with glucocorticoid therapy: a retrospective study. *Veterinary Dermatology* 23, 201-205.
- Saridomichelakis M.N., Olivry T. (2016) An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *The Veterinary Journal* 207, 29-37.
- Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. (2001). Canine atopic disease. In: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology. Sixth edition. W.B. Saunders. Philadelphia. PA. USA, 574-601. Quoted by: Saridomichelakis M.N., Olivry T. (2016). An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *The Veterinary Journal* 207, 29-37.
- Simpson A.C., Schissler J.R., Rosychuk R.A.W., Moore A.R. (2017). The frequency of urinary tract infection and subclinical bacteriuria in dogs with allergic dermatitis treated with oclacitinib: a prospective study. *Veterinary Dermatology* 28, 485-492.
- Torres S.M.; Diaz S.F.; Noguiera S.A., Jessen C., Polzin D.J., Gilbert S.M., Horne K.L. (2005). Frequency of urinary tract infection among dogs with pruritic disorders receiving long-term glucocorticoid treatment. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227 (2), 239-243.
- Zur G., Ihrke P.J., White S.D., Kass P.H. (2002). Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Veterinary Dermatology* 13(2), 89-102.

Naar een uniforme formule voor voederconversie via participatief onderzoek in de varkenshouderij

^{1,2}I. Chantziaras, ¹J. Van Meensel, ³S. De Smet, ²D. Maes, ¹S. Millet

¹ILVO, Scheldeweg 68, B-9090 Melle

²Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

³Varkensloket, Scheldeweg 68, B-9090 Melle

INLEIDING

Door de toenemende druk op de economische marges in de varkenshouderij neemt het belang van efficiënter produceren toe. De grootste kost bij het afmesten van vleesvarkens is het voeder, met een gemiddeld aandeel van ongeveer 75% in de totale afmestkosten (Departement Landbouw en Visserij). De voederkosten hangen af van de voederprijzen, maar ook van de voederconversie (VC), die ruwweg aangeeft hoeveel voeder nodig is om 1 kg groei te verkrijgen. Een verlaging van de VC resulteert in een economische winst en een reductie in de milieubelasting, door een verminderde behoefte aan voeder en een daling van de excretie. Ondanks het feit dat VC zo'n belangrijke parameter is, bestaat er geen uniforme berekening. ILVO en UGent gingen daarom samen met de sector op zoek naar een geschikte parameter en lanceerden een bijbehorende berekeningstool. Voor een volgende fase zoeken ze varkenshouders die graag willen weten hoe ze hun VC kunnen optimaliseren.

Geen uniforme formule voor voederconversie

Het ontbreken van een uniforme berekening voor VC maakt het moeilijk voor varkenshouders om in te schatten of ze een goed management voeren. Er zijn natuurlijk verschillende redenen waarom uniformiteit ontbreekt. Zo is het niet altijd eenvoudig om het levend gewicht van vleesvarkens te bepalen. Daardoor worden soms andere parameters, zoals karkasgewicht, gebruikt die gemakkelijker beschikbaar zijn. Bovendien worden formules vaak aangepast om informatie te bieden die het meest relevant is voor een specifieke varkenshouder of belanghebbende, en houden verschillende formules rekening met verschillende gewichtstrajecten of incorporeren ze sterfte op een verschillende manier.

Multidisciplinariteit als troef

In het kader van het VLAIO-LA traject "Naar een bedrijfseconomische en milieukundige win-win door efficiënter voedergebruik in de varkenshouderij", gingen ILVO en UGent op zoek naar een uni-

forme berekeningswijze voor VC. Hiervoor werden tal van belanghebbenden uit de sector betrokken in een participatief proces met verschillende overleg- en aftoetsmomenten. In totaal waren negen onderzoekers uit verschillende disciplines (dierwetenschappers, dierenartsen, landbouweconomen) betrokken en 25 belanghebbenden uit de Vlaamse primaire sector, de veevoederindustrie, de farmaceutische sector, fokorganisaties, bedrijven uit distributiesector, academische instellingen, onafhankelijke voorlichting en beleid.

Twee doelstellingen, twee formules

Het participatieve proces leverde twee verschillende parameters en bijbehorende formules op: karkasgroei per kg voeder en gestandaardiseerde karkasgroei per kg voeder. Beide plaatsen gewichtstoename in de teller en voedergebruik in de noemer, in tegenstelling tot de meeste bestaande formules voor VC. Op die manier sluiten de parameters beter aan bij conventionele productiviteitsparameters, zoals arbeids- of kapitaalproductiviteit. Daarenboven werd beslist te werken met warm karkasgewicht in plaats van levend gewicht, omdat dit standaard wordt gemeten in Vlaamse slachthuizen. Ook onze buurlanden en de meeste andere Europese landen werken met warm karkasgewicht. Karkasgroei per kg voeder dient als een objectieve weergave van de prestaties van de vleesvarkens in een productieronde. De gestandaardiseerde karkasgroei per kg voeder corrigeert voor sterfte (aan de hand van een lineair model) en is representatief voor een gewichtstraject van 25-115 kg (levend gewicht). Deze laatste formule maakt dat vergelijkingen tussen bedrijven veel eenvoudiger en eenduidiger zijn.

Aan de slag met de gebruiksvriendelijke webtool

Om de karkasgroei per kg voeder en gestandaardiseerde karkasgroei per kg voeder te berekenen werd een webtool gelanceerd (<https://varkensloket.be/tools/karkasgroei>). Die webtool maakt gebruik van zes gegevens die de gebruiker moet ingeven: het gemiddeld opleggewicht van de biggen, het aantal opge-

ILVO VARKENSLOKET

Kenniscentrum · Rekenmodules · Agenda & nieuws · Nieuwsbrief · Contact

Homa / Rekenmodules / Bereken de karkasgroei per kg verbruikt voeder

Binnen het VLAIO-project "Naar een bedrijfseconomische en milieukundige win-win door een efficiënt voedergebruik in de varkenshouderij" wordt onderzocht hoe we naar een algemeen aanvaarde formule voor de berekening van de voederconversie kunnen gaan. Na overleg met verschillende stakeholders uit de sector kwam een nieuw kengetal naar boven, namelijk de karkasgroei per kg voeder. Via onderstaande tool kan u de karkasgroei per kg voeder berekenen.

Opleggewicht biggen (kg)	<input type="text" value="24"/>
Aantal opgelegde biggen	<input type="text" value="200"/>
Aantal afgeleverde varkens	<input type="text" value="194"/>
Hoeveelheid verbruikt voeder (kg)	<input type="text" value="50700"/>
Afmestduur (dagen)	<input type="text" value="130"/>
Karkasgewicht (kg)	<input type="radio"/> Koud <input type="text" value="92"/> <input checked="" type="radio"/> Warm
Karkasgroei per kg voeder	<input type="text" value="0,282"/>
Gestandaardiseerde karkasgroei per kg voeder*	<input type="text" value="0,284"/>

* gecorrigeerd voor sterfte en representatief voor een gewichtstraject 25-115 kg (levend gewicht)

Figuur 1. Webtool om karkasgroei te bepalen.

legde biggen, het aantal afgeleverde varkens, de totale hoeveelheid voeder gebruikt tijdens de afmestperiode, de afmestduur en het gemiddelde karkasgewicht (warm of koud). Figuur 1 geeft een voorbeeld van de berekening.

In dit voorbeeld ligt de gestandaardiseerde karkasgroei per kg voeder 0,002 hoger dan de karkasgroei per kg voeder. Dit komt door de vertaling van het geobserveerde gewichtstraject 24-113 kg naar het standaardtraject 25-115 kg en het in rekening brengen van de lineaire correctie voor sterfte. Deze standaardisatie maakt het mogelijk om verschillende bedrijven te vergelijken of de prestaties van de boerderij in de tijd op te volgen.

Om de lezer vertrouwd te maken met de nieuwe formules, volgt nog een voorbeeld: gebaseerd op de huidige gemiddelde Vlaamse cijfers (Departement Landbouw en Visserij) werd in de webtool een gestandaardiseerde karkasgroei per kg voedingswaarde van ongeveer 0,295 bekomen.

Nieuwe formules, nieuwe perspectieven - Deelname aan het onderzoek

Komen tot nieuwe formules was één doelstelling van het onderzoek. Daarnaast willen ILVO en UGent nagaan welke factoren de karkasgroei per kg voeder beïnvloeden en hoe een varkenshouder kan inspelen op deze factoren. Hiervoor zijn we op zoek naar bedrijven met een vleesvarkenstak die willen meewerken en graag meer zouden willen weten over hoe ze hun karkasgroei per kg voeder kunnen optimaliseren. Deelnemers moeten bereid zijn tot een gesprek (maximum 2 uur) waarin een vragenlijst wordt ingevuld. Uiteraard garanderen de onderzoekers volledige confidentialiteit en een anonieme verwerking van de gegevens.

Voor vragen of deelname contacteer dierenarts Willem Neyrinck (willem.neyrinck@ugent.be, 09 264 75 40) of dierenarts Ilias Chantziaras (ilias.chantziaras@ilvo.vlaanderen.be, 09 272 26 01).

NOODSLACHTING OF EUTHANASIE VAN RUNDEREN

VRAAG

Wat is een 'goede veterinaire praktijk' om euthanasie bij het rund in de praktijk uit te voeren en dit zowel bij kalveren als bij (zware) volwassen dieren?

ANTWOORD

Om een rund buiten het slachthuis te doden, zijn er twee mogelijkheden: noodslachting of euthanasie. Verordening EG nr. 853/2004 stelt dat een noodslachting enkel mogelijk is wanneer een gezond dier een ongeval gehad heeft, waardoor het om welzijnsredenen niet levend naar het slachthuis vervoerd kan worden. In alle andere gevallen komt het dier automatisch niet meer in aanmerking om tot de voedselketen te worden toegelaten. De voorwaarden en praktische modaliteiten van een noodslachting worden toegelicht in de omzendbrief van het Federaal Agentschap voor de Veiligheid van de Voedselketen (FAVV) van 01/06/2014 met betrekking tot noodslachtingen van als landbouwhuisdier gehouden hoefdieren. Deze legt onder andere uit dat dieren die gedood worden omdat ze een dreigend gevaar opleveren voor personen of goederen, niet kunnen aangeboden worden in een slachthuis. Dit geldt eveneens voor in nood geslachte dieren die afgemaakt worden zonder slachtingsaangifte te doen, of die niet onderworpen zijn aan de ante-mortemkeuring. Dit laatste impliceert meteen dat een erkende dierenarts aanwezig moet zijn bij een noodslachting. Het dode dier moet tijdens het transport naar het slachthuis ook vergezeld worden van een verklaring van zowel de veehouder als de dierenarts (details over de inhoud van deze verklaring worden eveneens toegelicht in de betreffende omzendbrief).

Bij een noodslachting moet het dier meteen na bedwelming (bij runderen aan de hand van een penschiettoestel), gedood worden door verbloeding. Bij het bedwelmen met een penschiettoestel moet een juiste patroonsterkte gebruikt worden, moet het dier goed gefixeerd worden en moet het toestel op een correcte manier tegen de kop gedrukt worden, i.e. op de kruising tussen twee denkbeeldige lijnen, beide getekend tussen de laterale ooghoek en het midden van de tegenoverliggende hoornbasis. Indien correct uitgevoerd, zal het dier na het schieten onmiddellijk neervallen, de ledematen zullen verkrampen (dit kan gevolgd worden door ongecontroleerde bewegingen van de achterpoten), de ademhaling zal stilvallen en de ogen zullen centraal komen te staan, met een vergrote pupil en negatieve corneareflex. Hierna moet het rund zo snel mogelijk verbloed worden door een

combinatie van zowel een borststeek als een keelsnede, die diep en lang genoeg is om beide halsslagaders door te snijden.

Wanneer niet aan de voorwaarden voor een noodslachting voldaan kan worden en een dier toch gedood moet worden, spreekt men over euthanasie, ongeacht of dit medicamenteus of met andere middelen gebeurt. Het vlees mag bij euthanasie niet geconsumeerd worden en het karkas is bestemd voor vernietiging. Het Departement Omgeving, luik Leefmilieu, Natuur en Energie (LNE) van de Vlaamse overheid stelt op de website: <https://www.lne.be/doden-van-dieren-op-een-landbouwbedrijf> dat, praktisch gezien, bedwelming met een penschiettoestel, gevolgd door verbloeding, de enige methode is die een veehouder zelf mag toepassen, op voorwaarde dat hij/zij hiervoor de nodige bekwaamheid en apparatuur bezit. Het LNE stelt echter op dezelfde website eveneens dat euthanasie bij voorkeur door middel van een dodelijke injectie gebeurt, wat enkel door een dierenarts mag uitgevoerd worden.

Voor een dodelijke injectie zijn er op dit ogenblik voor runderen drie middelen geregistreerd in België: enerzijds een combinatie van embutramide, mebenzonium-iodide en tetracaïne (huidige merknaam T 61®) en anderzijds twee middelen met als actief bestanddeel pentobarbital (huidige merknamen Euthasol Vet® en Release®).

Embutramide is een anestheticum dat bewustzijnsverlies induceert en dat de ademhalings- en vasomotorcentra in de hersenen krachtig onderdrukt. Mebenzonium-iodide is een spierrelaxans, die ervoor zorgt dat het dier zich niet meer kan bewegen en niet langer in staat is adem te halen. Tetracaïne is een lokaal anestheticum dat moet zorgen voor een pijnloze injectie. De dood treedt op door ernstige onderdrukking van het centrale zenuwstelsel, ademhalingsstilstand, een gebrek aan zuurstof en een collaps van de circulatie. Een studie bij varkens van Baumans, et al. (1998) toonde aan dat intracardiale injectie van T 61® snelle bewusteloosheid en sterfte induceert 'met minimaal ongemak voor het dier'. Ook bij honden en konijnen werd in Nederland aangetoond dat T 61® een aanvaardbaar product is voor euthanasie (Hellebrekers et al., 1990). Het verlies van bewustzijn (gemeten met een elektro-encefalogram) en de relaxatie van de spieren gebeuren simultaan, zodat mag aangenomen worden dat de ademhaling pas stilvalt wanneer de dieren zich er niet meer van bewust zijn. Toch deed deze studie vermoeden dat T 61® enkele 'emotioneel onaangename nevenwerkingen' heeft. Dit vermoeden komt overeen met wat in een studie bij runderen van Blank et al. (2010) werd waargenomen. Daarin werd aangetoond dat T 61® vaker excitatie veroorzaakte dan pentobarbital (Blank et al., 2010). Dit zou vooral het

geval zijn bij (te) snelle injectie van het product. Bij slechte resorptie bestaat bovendien de kans dat perifere paralyse optreedt vooraleer de dieren het bewustzijn verliezen. De bijsluiter stelt dan ook duidelijk dat T 61® enkel toegediend mag worden aan dieren die al buiten bewustzijn (onder narcose) zijn, teneinde verstikking van het dier bij bewustzijn te vermijden. Bovendien mag het product niet toegediend worden aan drachtige dieren. Tot slot vermeldt de bijsluiter nog dat T 61® histopathologische afwijkingen veroorzaakt, zoals endotheelschade, stuwings in de longen, longoedeem en hemolyse. Hier dient rekening mee gehouden te worden in het kader van een eventuele lijkschouwing.

Pentobarbital is een oxybarbituraat dat in België enkel geregistreerd is voor euthanasie van dieren. Zoals met andere barbituraten zorgt een lage dosis voor excitatie, door inhibitie van de inhibitorische interneuronen in de hersenen. Hogere dosissen veroorzaken echter anesthesie, terwijl een overdosis leidt tot ernstige depressie van de respiratoire en cardiovasculaire centra in de hersenen, waardoor sterfte optreedt. Om de excitatoire fase en eventuele convulsies tijdens de inductiefase te vermijden, wordt het beste goede premedicatie gebruikt en wordt bij voorkeur meteen een hoge dosis op een snelle manier toegediend. Bij runderen dient de injectie volgens de bijsluiter intraveneus te gebeuren. Als dit niet mogelijk is, kan het product ook intracardiaal worden toegediend, maar enkel na voorafgaande (diepe) sedatie. Intraperitoneale en intrapulmonale toediening is niet toegelaten bij runderen. Bij euthanasie met pentobarbital zonder voorafgaande sedatie of anesthesie gebeurt het nu en dan dat de dieren enige tijd na het verlies van de corneareflex nog één of meerdere malen ‘naar lucht happen’. Hoewel het hoogstwaarschijnlijk om onvrijwillige spiercontracties gaat van een bewusteloos of reeds gestorven dier, kan dit een onaangenaam beeld zijn voor bijvoorbeeld de eigenaar. Dit effect wordt niet gezien bij het gebruik van T 61®, mogelijk door het curariserend effect van mebenzonium-iodide.

Samenvattend kan gesteld worden dat beide producten goed geschikt zijn voor euthanasie van runderen en bij voorkeur toegediend worden aan een reeds gesedeerd dier (pentobarbital) of een dier dat onder narcose is (T 61®). Hoewel pentobarbital intraveneus gebruikt kan worden zonder voorafgaande medicatie, is sedatie (of algemene anesthesie) aan te raden om de inductie/euthanasie rustiger te laten verlopen. Bij gebruik van Euthasol Vet® bij runderen is volgens de bijsluiter premedicatie met een gepast sedativum sowieso verplicht. T 61® mag enkel bij dieren onder narcose gebruikt worden, mag niet bij drachtige dieren toegepast worden en wordt wellicht beter niet gebruikt bij dieren waarbij post mortem histopathologisch onderzoek gepland is (vooral als het de longen betreft). Beide producten zijn vrij irriterend en bij perivasculaire injectie kan de dood met vertraging intreden, dus worden ze het beste enkel via een veneuze katheter toegediend.

Hier volgt een aan te raden protocol voor medicamenteuze euthanasie van runderen:

- **Sedatie**
 - o xylazine (0,1 mg/kg IV of 0,2 mg/kg IM) of detomidine (10-20 µg/kg IV of 20-40 µg/kg IM)
 - o plaatsen van veneuze katheter (kan vóór of na sedatie)
- **Verder verloop afhankelijk van product**
 - o Met T 61®
 - inductie met ketamine 2 mg/kg IV
 - eens het dier onder narcose is: T 61® 1 mL per 10 kg lichaamsgewicht IV
 - o Met pentobarbital
 - 45-90 mg/kg IV (bijsluiter Release®) of 40 mg/kg (bijsluiter Euthasol Vet®)
 - Afhankelijk van het toe te dienen volume kan men opteren om hierbij eerst de anesthesie te induceren met een dosis van 10 mg/kg IV en het resterend volume pas toe te dienen na bewustzijnsverlies.
- **Tips**
 - o Kies een geschikte plaats om de euthanasie uit te voeren (voldoende ruime omgeving, voldoende licht, op een plaats waar het gestorven dier makkelijk kan weggehaald worden)
 - o Gebruik steeds een veneuze katheter
 - o Verifieer of het dier daadwerkelijk gestorven is (geen voelbare pols en geen hoorbare hartslag bij auscultatie, apnee en een negatieve corneareflex gedurende >5 à 10 minuten)

REFERENTIES

- Baumans V., Meijer J.C., Haberham Z.L., de Groot H.N., Hellebrekers L.J. (1998). Euthanasia of piglets: gas or injection? *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 123, 738-742.
- Blank C., Metzner M., Lorch A., Klee W. (2010). Euthanasia of cattle: a clinical comparison of T 61 and pentobarbital (Eutha 77). *Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift* 123, 96-102.
- Hellebrekers L.J., Baumans V., Bertens A.P., Hartman W. (1990). On the use of T61 for euthanasia of domestic and laboratory animals; an ethical evaluation. *Laboratory Animals* 24, 200-204.

Dr. S. Schauvliege,
Vakgroep Heelkunde en Anesthesie
van de Grote Huisdieren,
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

EICELTRANSPLANTATIE (1954)

Wie zou denken dat superovulatie en eiceltransplantatie relatief recent ontwikkeld werden, mag hieronder een meer dan zestig jaar oude tekst lezen.

Cruciaal is de vorming van het corpus luteum, waarin progesteron geproduceerd wordt dat het baarmoederslijmvlies in gereedheid brengt voor de innesteling van de bevruchte eicel. Als de eicel niet bevrucht is, wordt de hypofyse onder invloed van progesteron aangezet tot vorming van FSH, dat de groei van de follikel stimuleert. Als de productie van FSH begint af te nemen, wordt door de hypofyse LH gesecreteerd. Dat brengt de ovulatie teweeg. Op dat ogenblik van de cyclus is er geen progesteron meer aanwezig door de involutie van het CL. Na de ovulatie ontwikkelt zich onder invloed van LH een nieuw CL. Er wordt weer progesteron gevormd en de cyclus herbegint.

Omdat de hypofysaire hormonen niet kunnen gesynthetiseerd worden, dient men met het oog op superovulatie 1500 à 3000 eenheden PMS toe. Dit bevat veel FSH en een kleine hoeveelheid LH. PMS elimineert traag en vereist slechts één enkele dosis. In de menselijke geneeskunde is gebleken dat er na herhaalde toediening van PMS antihormonen gevormd worden die de gonadotrope hormonen neutraliseren. Bij runderen worden cysteuzen follikels en afwijkende CL vastgesteld.

Bij toediening van PMS tussen de zesde en de negende dag van de cyclus, in aanwezigheid van een jong CL, worden veel follikels gevormd maar ze ovuleren niet: het progesteron uit het CL verhindert de ovulatie. Voor de ovulatie is immers LH nodig en de afwezigheid van een CL. Na toediening van PMS rond de zeventiende dag bij afgaand CL, is er evenmin ovulatie, wat op te lossen is door LH-toediening, maar de eicellen blijken dan een versnelde migratie te vertonen. De baarmoeder is er nog niet klaar voor om ze te ontvangen. Die verhoogde transit is het gevolg van een overmaat van FSH in aanwezigheid van een CL.

Toediening van PMS binnen de bronstperiode valt negatief uit, wellicht omdat er dan geen CL aanwezig is. Als PMS geïnjecteerd wordt in het begin van de cyclus

gevolgd door enucleatie van het CL na vier dagen, zijn wel ovulaties te verwachten, maar het grootste deel van de eicellen blijft versneld migreren. PMS wordt dus het beste toegediend in het midden van de cyclus, wanneer de activiteit van het CL al tien tot elf dagen aanhoudt. De werking van het CL mag echter niet te lang duren om een versnelde transit te vermijden en om de bronst niet te belemmeren. Daarom wordt het CL halverwege de cyclus geëucleëerd. Op die manier wordt een sterke follicelgroei bekomen met meervoudige ovulaties en veel leefbare eicellen die geen versneld migratiegedrag vertonen.

De donoren worden geïnsemineerd tijdens de bronst. Het uitspoelen van de eicellen geschiedt het beste als ze in het viercellige stadium zitten, ongeveer 56 uur na de oestrus. Dan is het nieuwe CL twee dagen oud. Het opvangen van de bevruchte eicellen geschiedt in homolog serum.

De eicellen worden langs vaginale weg in de baarmoeder van de receptor gebracht. Dit mag niet gebeuren wanneer de receptoren bronstig zijn, maar rond de vierde of de vijfde dag, in aanwezigheid van een jong CL. Dan zijn immers de omstandigheden gunstig voor innesteling. Het inbrengen van materiaal in de baarmoeder buiten de bronst veroorzaakt echter infecties die niet te beïnvloeden zijn door antibiotica. Het is louter de aanwezigheid van het CL, noodzakelijk voor de innesteling, dat die infecties bevordert. Bij manipulatie buiten de bronst is dus een strikte asepsie vereist. Op die manier kan men 24 uur na het einde van de oestrus eicellen inbrengen en tegelijk de actie van het CL ontwijken, die tot infecties kan leiden. Wanneer de eicellen de baarmoeder bereiken, is het nieuwe CL gevormd dat de innesteling bevordert.

Besluit: de kennis van de fysiologie is de basis van elke vooruitgang in de zoötechniek!

Naar de tekst van een conferentie 'La transplantation ovulaire', gepresenteerd door Luc Henriët (Kuregem 1945) voor de Société de Médecine Vétérinaire du Brabant op 14 november 1954. Verschenen in Annales de Médecine Vétérinaire, 1955, p 343-359.

Vertaling en bewerking door Johan De Smet



Advocate®



Advocate® werkt preventief en curatief tegen *Angiostrongylus vasorum*!



Meer info op www.slakkendodelijk.be



Advocate® spot-on oplossing voor honden. (100 mg/ml imidacloprid en 25 mg/ml moxidectine). • **Indicaties:** Voor honden die lijden aan, of risico lopen op, gemengde parasitaire infecties: Voor de preventie en behandeling van vlooiënbesmetting (*Ctenocephalides felis*), de behandeling van bijtende luizen (*Trichodectes canis*), de behandeling van oormijtinfestatie (*Otodectes cynotis*), schurft (veroorzaakt door *Sarcoptes scabiei var. canis*), demodicosis (veroorzaakt door *Demodex canis*), de preventie van hartworm (L3 en L4 larven van *Dirofilaria immitis*), de behandeling van circulerende microfilariae (*Dirofilaria immitis*), de behandeling van cutane dirofilariosis (volwassen stadia van *Dirofilaria repens*), de preventie van cutane dirofilariosis (L3 larven van *Dirofilaria repens*), de vermindering van circulerende microfilariae (*Dirofilaria repens*), de preventie van *Angiostrongylus vasorum* (angiostrongylosis) (L4 larven en onvolgroeide stadia), de behandeling van *Angiostrongylus vasorum* en *Crenosoma vulpis* de preventie van spirocerosis (*Spirocerca lupi*), de behandeling van *Eucloptus gyn. Capillaria* (volwassen stadia), de behandeling van de oogworm *Thelazia callipaeda* (volwassen stadia), de behandeling van infecties met gastro-intestinale nematoden (L4 larven, onvolgroeide en volwassen stadia van *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* en *Uncinaria stenocephala*, volwassen *Toxascaris leonina* en *Trichuris vulpis*). Het product kan gebruikt worden als onderdeel van een behandelingsstrategie tegen door vlooiën veroorzaakte allergische dermatitis (FAD). • **Contra-indicaties:** Niet gebruiken bij puppes jonger dan 7 weken. Niet gebruiken bij overgevoeligheid voor één van de bestanddelen van dit product. Niet gebruiken bij honden geïncubeerd als klasse 4 voor hartworm want de veiligheid van het product is niet onderzocht in deze diergroep. Bij katten moet het corresponderende product 'Advocate voor katten' (0,4 of 0,8 ml) gebruikt worden, dat 100 mg/ml imidacloprid en 10 mg/ml moxidectine bevat. Bij fretten: Advocate voor honden niet gebruiken. Enkel 'Advocate voor kleine katten en fretten' (0,4 ml) mag gebruikt worden. Niet gebruiken bij kanaries. • **Bijwerkingen:** Het gebruik van het product bij honden kan gepaard gaan met een voorbijgaande jeuk. In zeldzame gevallen kunnen vetzig haar, erythema en braken voorkomen. Deze symptomen verdwijnen zonder verdere behandeling. In zeldzame gevallen kan het product een lokale overgevoelighedsreactie veroorzaken. Wanneer het dier na de behandeling op de plaats van toediening ligt, kunnen in zeer zeldzame gevallen neurologische symptomen (waarvan de meeste van voorbijgaande aard) waargenomen worden. Het product smaakt bitter en speeksel kan voorkomen wanneer het dier de plaats van toediening likt onmiddellijk na behandeling. Dit is geen symptoom van intoxicatie en verdwijnt na enige minuten zonder behandeling. Correct gebruik minimaliseert de mogelijkheid voor het dier de toedieningsplaatsen te likken. In zeer zeldzame gevallen kan het product ter hoogte van de toedieningsplaats een sensatie veroorzaken, resulterend in voorbijgaande gedragsveranderingen zoals sloomheid, agitatie of gebrek aan eetlust. Een veld studie heeft aangetoond dat honden positief voor hartworm met microfilaraemia risico lopen op ernstige respiratoire symptomen (hoesten, tachypneu en dyspneu) die snelle veterinaire behandeling kan vereisen. In de studie werden deze bijwerkingen waargenomen bij 2 van 106 behandelde honden. Ook gastro-intestinale symptomen (braken, diarree, gebrek aan eetlust) en lethargie zijn mogelijke bijwerkingen na de behandeling. • **Dosering:** Doseringsschema: De aanbevolen minimumdosering bedraagt 10 mg/kg lichaamsgewicht imidacloprid en 2,5 mg/kg lichaamsgewicht moxidectine, equivalent aan 0,1 ml/kg lichaamsgewicht Advocate voor honden. Het behandelingschema dient gebaseerd te worden op de lokale epidemiologische situatie.



anibidiol®

Voor honden en katten



© 05/2019 Virbac. All rights reserved.

Bevat CBD olie, vitamine B3 (niacine) & B6

Anibidiol® versterkt stabiliteit in het gedrag en reduceert vermoeidheid

- Aanvullend diervoeder voor honden en katten met natuurlijk hennepextract
 - Anibidiol® Regular bevat 2,5 mg cannabidiol (CBD) per zakje
 - Anibidiol® Plus bevat 8 mg CBD per zakje
- Toedieningswijze:
 - direct over het eten strooien
 - eerst oplossen in vloeistof om dan over het eten te gieten

Shaping the future
of animal health

Virbac