

Intossicazione da doxiciclina in vitelli di razza Frisona Italiana: descrizione clinica e indagini anatomopatologiche



ELEONORA COPPOLETTA¹, EDOARDO TUCCIA², EMANUELE INVERNIZZI³, PIETRO RICCABONI²

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

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

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

RIASSUNTO

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

PAROLE CHIAVE

Vitelli; intossicazione; doxiciclina.

DESCRIZIONE DEL CASO

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

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

Corresponding Author:

Eleonora Coppoletta (eleonora.coppoletta@unimi.it).

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

ESAME ANATOMOPATOLOGICO MACROSCOPICO

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

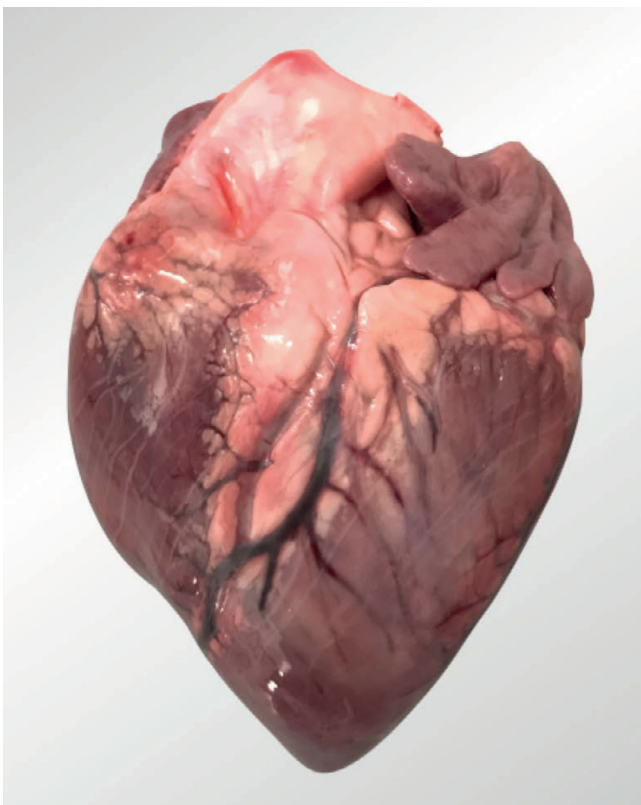


Figura 1 - Cuore. Presenza di bande di decolorazione che, perpendicolarmente al solco coronarico, si spingono nel ventricolo sinistro.

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

ESAME ISTOPATOLOGICO

Tutti i campioni tissutali sono stati fissati in formalina tamponata e inclusi in paraffina mediante inclusore Sakura®Tissue-Tek®VIP®; sono state quindi ottenute sezioni di 5 µm, mediante microtomo rotativo Leica RM2125RT, colorate con Ematossilina-Eosina. Le sezioni di muscolatura scheletrica e di miocardio sono state sottoposte a colorazione di Von Kossa e quelle di rene, di spessore di 3 µm, sono state colorate mediante reazione PAS (*Periodic Acid Schiff*). La lettura è stata effettuata mediante microscopio ottico Olympus BX51 e le immagini acquisite con sistema digitale Olympus DP70.

Anche i reperti istologici risultavano sovrapponibili in tutti i soggetti esaminati. Le fibre muscolari della lingua presentavano moderata infiltrazione linfoplasmacellulare, diffusa ialinosi e stampi trombotici intravasali contenenti cellule infiammatorie. Erano inoltre presenti diffusi reperti di calcificazione distrofica delle fibre muscolari degenerate (Figura 3B). I campioni di polmone permettevano di evidenziare marcata ipere-



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

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

DISCUSSIONE

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

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

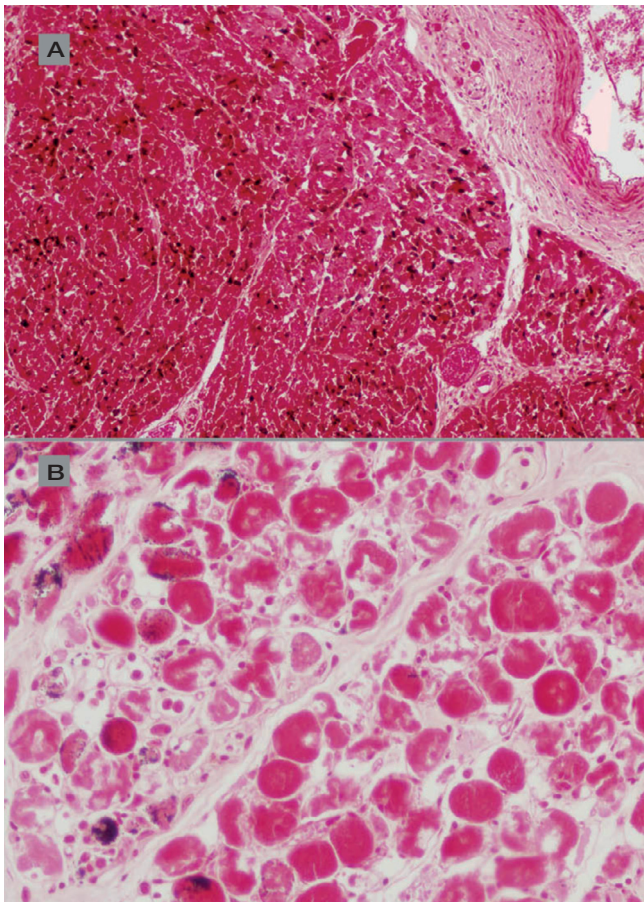


Figura 3 - Sezioni istologiche. **A)** Cuore. Aree multifocali di calcificazione distrofica a carico delle fibre miocardiche degenerate. Von Kossa, 10x. **B)** Lingua. Multifocali aree di calcificazione distrofica a carico delle fibre muscolari degenerate. Von Kossa, 40x.

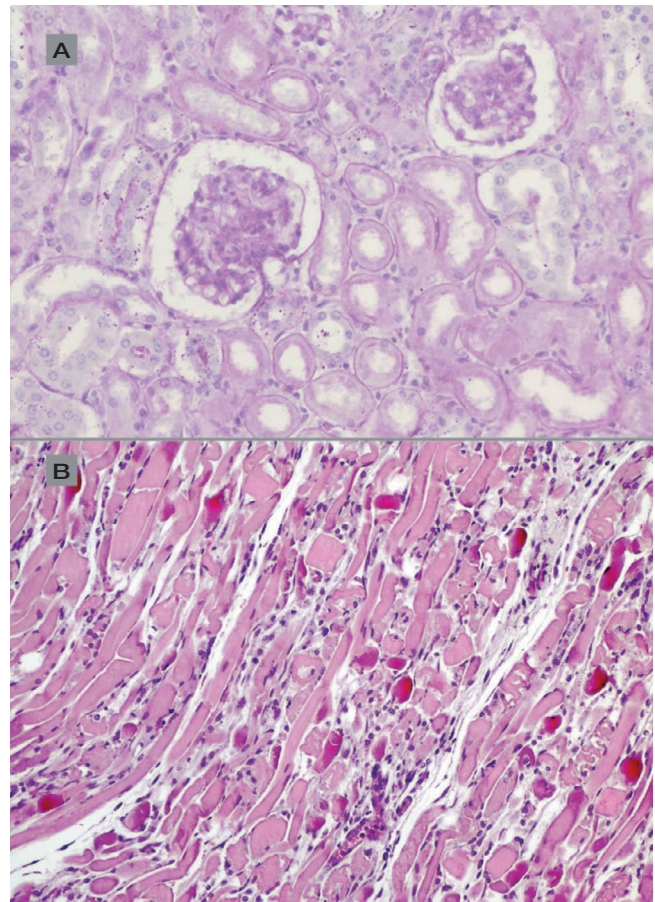


Figura 4 - Sezioni istologiche. **A)** Rene. Presenza di materiale PAS positivo all'interno dei tubuli e diffusi reperti di necrosi dell'epitelio tubulare che mantiene la connessione con la membrana basale del tubulo stesso. PAS, 25x. **B)** Muscolo semitendinoso. Evidenti reperti di degenerazione ialina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

no, causa ultima del decesso di tutti i soggetti. Le analoghe lesioni delle fibre muscolari scheletriche spiegano il decubito manifestato da 4 soggetti. Tanto nei vitelli considerati, quanto nei casi descritti in letteratura^{7,16}, era presente una grave sintomatologia respiratoria. L'edema polmonare, cui viene in tal senso attribuito un ruolo importante^{7,16}, non era presente, ma erano tuttavia significativi i quadri degenerativi della muscolatura diaframmatica e intercostale esterna, nonché broncopolmonite *ab ingestis*. La necrosi tubulare acuta era stata documentata nel bovino solo una volta⁶. La doxiciclina non ha escrezione primaria renale ma enterica, quindi il danno a questo livello non è imputabile ad un'azione tossica diretta, ma alla ridotta perfusione renale, dovuta al danno cardiaco^{11,12}. La normativa vigente¹³ prevede che i medicinali veterinari contenenti antimicrobici da somministrarsi attraverso l'alimento non possano essere oggetto di scorta; tuttavia, all'allevatore ne è concessa la detenzione di un quantitativo ridotto, commisurato ad un trattamento di durata non superiore ai 7 giorni, per eventuali terapie d'urgenza¹⁴. La crisi economica, anche nel settore dell'allevamento del bovino da latte, comporta la riduzione delle risorse destinate alla cura degli animali, in particolare quelli improduttivi come i vitelli¹⁵. In situazioni di emergenza si possono pertanto creare i presupposti per un uso non conforme del farmaco, che non viene preceduto dalla visita clinica da parte del medico veterinario, né da indagini microbiologiche. I danni iatrogeni in medicina veterinaria comprendono quelli commessi dal medico veterinario e quelli imputabili al personale di stalla. Il presente episodio di intossicazione ne rappresenta un chiaro esempio, nel quale un errore di interpretazione del foglietto illustrativo ha determinato la perdita di 10 soggetti, 7 dei quali destinati alla rimonta aziendale.

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

SUMMARY

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

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

KEY WORDS

Calves; intoxication; doxycycline.

Bibliografia

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