

**VERIFICA DEGLI EFFETTI FLOGISTICI DELLO SVEZZAMENTO
PRECOCE NEL SUINETTO E LORO MODULAZIONE
MEDIANTE SOMMINISTRAZIONE DI INTERFERON-ALFA**

***ASSESSMENT OF THE INFLAMMATORY RESPONSE TO
EARLY WEANING IN PIGLETS: IMPACT OF AN ORAL
INTERFERON-ALPHA TREATMENT***

P. CANDOTTI, S. ROTA NODARI, E. RAZZUOLI, S. DOTTI, M. AMADORI

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia
e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini"
Sede di Brescia*

Parole chiave: suino, svezzamento, interferon- α , citochine.

Key words: pig, weaning, interferon- α , cytokines.

Riassunto. Lo scopo di questo studio è stato di valutare in suinetti di campo gli effetti di due diverse date di svezzamento (22 e 28 giorni di vita) mediante la valutazione di alcuni parametri immunologici (IFN- α , TNF- α , IL-6) e della capacità di accrescimento. E' stato inoltre valutato il possibile effetto di modulazione da parte di IFN- α somministrato a basso dosaggio *per os*. La prova è stata condotta su 59 suinetti, divisi in tre gruppi, il primo svezzato a 28 giorni, il secondo a 22 ed il terzo gruppo sempre a 22 e sottoposto a trattamento con IFN- α . I dati ottenuti indicano che la somministrazione di questa citochina svolge un effetto positivo sulla modulazione del circuito delle citochine infiammatorie, migliorando la capacità di risposta omeostatica allo stress scatenato dallo svezzamento precoce.

Summary. Weaning of piglets at 22 and 28 days was investigated in terms of cytokine response (IFN- α , TNF- α , IL-6) and growth parameters. The effects of an oral, low-dose IFN- α treatment at weaning were evaluated as well. The trial was carried out on 59 piglets of the same farm, allocated to three groups: the first and the second groups were weaned at 28 and 22 days, respectively; the third one was weaned at 22 days and treated with IFN- α . Results indicate that IFN- α can effectively modulate the circuits of the inflammatory cytokine response, thus improving the homeostatic response to the early weaning stressor.

INTRODUZIONE

Lo svezzamento dei suinetti è uno dei momenti più critici dell'intero ciclo dell'allevamento suino. Vi sono infatti numerosi fattori che possono determinare problemi più o meno gravi agli animali nel momento dell'allontanamento dalla madre (cambiamento dell'alimentazione, immaturità dell'epitelio intestinale, rimescolamento delle nidiate, variazioni nella temperatura e nell'umidità dei capannoni, ecc). In questo scenario, nella letteratura scientifica sono stati approfonditi i legami funzionali tra risposta immunitaria innata, flogosi e stress; proprio la risposta flogistica viene considerata come un meccanismo di primaria importanza per i processi omeostatici dell'ospite nei confronti degli

stressors, sia di origine infettiva che non infettiva (Amadori M., 2007).

Lo svezzamento precoce dei suinetti è sicuramente una pratica di allevamento che gioca un ruolo fondamentale nell'insorgenza di *stress* negli animali; infatti, a tre settimane di vita il sistema immunitario del suino e la mucosa intestinale non sono ancora completamente maturi; quindi, un'esposizione precoce agli antigeni della dieta *starter* può determinare un'alterazione del corretto assorbimento dei nutrienti e degli elettroliti, con conseguenze negative sia sullo stato immunitario locale sia sulla microflora intestinale (Barnett K.L. *et al.* 1989, Nabuurs M.J.A. *et al.* 1993). L'età dei soggetti è di particolare importanza al fine di minimizzare le possibili perdite che si verificano in questo momento. L'associazione di varie componenti di stress fisico, nutrizionale, immunologico ed emozionale è fra i motivi che hanno spinto il Legislatore ad indicare il termine dei 28 giorni come quello indicato per lo svezzamento dei suinetti (D.Lgs. 20/02/2004 n° 53).

Vi sono indicazioni che lo svezzamento precoce determina una cospicua risposta omeostatica compensativa, la quale si evidenzia con la comparsa di interferon- α (IFN- α) nel siero degli animali nei giorni successivi allo svezzamento (Amadori M., 2007).

Sulla base di precedenti risultati ottenuti mediante la valutazione di un modello suino SPF, è stato evidenziato come l'IFN- α , *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) ed Interleuchina-6 (IL-6) sierici giochino un ruolo importante nella risposta omeostatica ad eventi stressanti di varia natura e come la somministrazione di IFN- α *per os* possa sostituire in parte il fabbisogno di tale risposta endogena (Amadori M., 2007). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di focalizzare l'attenzione alla pratica dell'allevamento intensivo, al fine di acquisire ulteriori dati sulla risposta flogistica allo svezzamento precoce, nonché di valutare il possibile effetto di modulazione da parte di IFN- α somministrato a basso dosaggio *per os*.

MATERIALI E METODI

1.1. *Animali*

In un allevamento di suini a ciclo chiuso sono state individuate in forma random sei nidi di suinetti per un totale di 59 animali aventi tutti la medesima componente genetica, *Large White x Landrace* da parte di madre ed ibrido commerciale da parte di padre.

I suinetti sono stati successivamente suddivisi in tre gruppi identificati come gruppo 1 formato da 19 animali, gruppo 2 e gruppo 3 costituiti da 20 soggetti ciascuno.

I suinetti del gruppo 1 sono stati svezzati a 28 giorni di vita, come previsto dal D.Lgs. 20/02/2004, n. 53, mentre i suinetti dei gruppi 2 e 3 sono stati svezzati più precocemente a 22 giorni. Gli animali appartenenti al gruppo 3 sono stati trattati a partire dal giorno dello svezzamento (giorno 0) per 10 giorni consecutivi con IFN- α somministrato nell'acqua di bevanda, ad un dosaggio pari a 1 UI/kg di p.v./die; tale somministrazione è stata eseguita mediante l'ausilio di un dosatore automatico, al fine di riuscire a regolare in modo corretto l'assunzione della citochina in funzione del fabbisogno idrico previsto per gli animali.

1.2. *Parametri clinici e crescita*

A 15 giorni di vita i suinetti sono stati identificati e sottoposti ad una valutazione clinica generale (esame obiettivo generale), al fine di escludere stati patologici che potessero influenzare negativamente l'esito della sperimentazione. Successivamente, a intervalli periodici, ogni soggetto è stato sottoposto a pesatura per la valutazione dell'incremento ponderale giornaliero (IPG).

1.3. Prelievi ed analisi di laboratorio

Ogni suinetto a 0, +6 e +26 giorni dallo svezzamento è stato sottoposto ad un prelievo di sangue in provette prive di anticoagulante. Una volta in laboratorio, il sangue raccolto è stato mantenuto a temperatura ambiente per 2 ore, successivamente refrigerato per 30 minuti e quindi centrifugato a 4°C per 15 minuti a 2000 rpm, in seguito è stato raccolto il siero e conservato a -80°C. Su tali campioni, sono state valutate su colture cellulari le seguenti citochine: TNF- α (valutazione citotossicità su cellule WEHI 164, come descritto in Asai, T., *et al.* 1993), IL-6 (saggio biologico di crescita su cellule 7TD1 dipendenti da IL-6, Grenett, H.E., *et al.* 1991), IFN- α (valutazione attività antivirale su cellule MDBK, Meager A. 1987).

1.4. Analisi statistica

La valutazione degli effetti distinti del tempo trascorso in allevamento e del trattamento con IFN- α sugli indici di accrescimento ponderale è stata effettuata mediante analisi della varianza a due stadi (Prism 2.01, GraphPad Software, San Diego, CA). La soglia di significatività è stata posta a $P < 0.05$.

RISULTATI

2.1. Parametri clinici e di crescita

Al momento dell'inclusione nella prova tutti gli animali erano in ottime condizioni sanitarie. Le nidiatae degli animali in esame hanno manifestato buone condizioni cliniche per tutta la durata della prova, al pari delle altre nidiatae presenti nel medesimo capannone. In particolare, non si sono riscontrate differenze cliniche tra i suini svezzati precocemente (22 giorni) e quelli svezzati più tardivamente (28 giorni).

Gli accrescimenti ponderali dei suinetti sono riportati in tabella 1. A tale proposito, emerge una differenza significativa ($P < 0.001$) tra gli animali del gruppo 2 e quelli del gruppo 3; infatti i soggetti trattati con IFN- α (gruppo 3) hanno presentato a 47 giorni di vita un incremento complessivo di circa 1,5 kg in più rispetto al gruppo non trattato (tabella 1).

Tabella 1: Accrescimento ponderale dei suinetti

	Giorni attorno allo svezzamento (giorni di vita)					
	- 9 (19)	-1 (21)	+6 (28/34)	+12 (34)	+19 (47)	+26(48)
Svezzati 28 gg	5.974 \pm 0.716	NE	10.16 \pm 0.898	NE	15.24 \pm 1.759	
Svezzati 22 gg	NE	6.028 \pm 0.931	7.667 \pm 1.383	8.667 \pm 1.562	NE	13.72 \pm 2.396
Svezzati 22 gg trattati IFN α	NE	7.075 \pm 1.15	8.800 \pm 1.250	9.525 \pm 1.23	NE	15.200 \pm 2.353

I dati sono espressi come peso medio in Kg \pm 1 deviazione standard; in grassetto sono riportati i dati ponderali dei suinetti corrispondenti ai medesimi giorni di vita all'interno dei 3 gruppi

Results are shown as mean weight (Kg) \pm 1 standard deviation; weight data corresponding to the same age of piglets in the three groups are highlighted in bold.

Suddividendo il periodo che va dai 21 giorni di vita ai 48 in tre fasce (21-28 , 28-34 , 34-48 giorni), non è possibile evidenziare alcuna differenza tra gli IPG medi dei due gruppi di suinetti svezzati a 22 giorni durante il primo periodo, mentre nel secondo (28-34 g) il gruppo 3 presenta addirittura un IPG medio inferiore rispetto al gruppo 2. La differenza tra il gruppo dei trattati e dei non trattati appare invece evidente durante il terzo periodo (34-48 g) con una dinamica nettamente più favorevole nei trattati (tabella 2).

Tabella 2: Accrescimento ponderale medio giornaliero dei suinetti svezzati a 22 giorni

Gruppo suinetti	21-28 giorni	28-34 giorni	34-48 giorni
2, svezzato a 22 g	239±123 g	171±103 g	361±99 g
3, svezzato a 22 g +IFN-α	246±72 g	123±94 g	404±105 g

I valori sono espressi in grammi come media \pm 1 deviazione standard

Daily mean weight gains (grams) are shown as mean \pm 1 standard deviation.

2.2. Parametri ematici

Per quanto riguarda i parametri immunologici, il TNF- α sierico diminuisce in tutti i gruppi nella prima settimana post-svezzamento, per poi aumentare fino al giorno +26 (tabella 3) con una risposta particolarmente elevata nel gruppo 2, dove 20 soggetti su 20 hanno presentato una risposta superiore a 300 pg/ml. Nei soggetti svezzati a 22 giorni, l'andamento di questa citochina risulta essere inversamente proporzionale rispetto ai valori sierici di IL-6, per la quale si assiste ad un aumento nella prima settimana post svezzamento seguito da drastica diminuzione fino al giorno +26 con valori di 2,5 pg/ml (tabella 4). I valori di IL-6 sono inoltre particolarmente elevati nel gruppo 1 svezzato a 28 giorni.

Tabella 3: Valori di TNF- α sierico

Gruppo suinetti	Giorno 0 (svezzamento)	Giorno + 6	Giorno + 26
1 svezzato a 28 g	178 (2/19)	36 (1/19)	736 (13/19)
2 svezzato a 22 g	450 (6/20)	108 (2/20)	12050 (20/20)
3 svezzato 22 g +IFN-α	364 (7/20)	65 (2/20)	2613 (13/20)

Viene riportato il valore (in pg/ml) che corrisponde al 75° percentile della distribuzione e, tra parentesi, il numero di suini sul totale con presenza di elevata risposta (\geq 300 pg/ml).

Serum TNF- α concentrations (pg/ml) are shown as 75% percentile values. Also, the number of high-responder pigs (\geq 300 pg/ml) out the total is reported between brackets.

Tabella 4: Valori di IL-6 sierici

Gruppo suinetti	Giorno 0 (svezzamento)	Giorno + 6	Giorno + 26
1 svezzato a 28 g	\geq 10000	5770	2.5
2 svezzato a 22 g	450	5180	2.5
3 svezzato 22 g +IFN-α	2317	5725	2.5

Viene riportato il valore (in pg/ml) che corrisponde al 75° percentile della distribuzione.

Serum IL-6 concentrations (pg/ml) are shown as 75% percentile values.

Per quanto concerne la produzione di IFN- α endogeno, la risposta nella prima settimana post svezzamento risulta meno frequente nei suinetti svezzati a 28 giorni (gruppo 1), con 7 soggetti positivi su 19, rispetto ai suinetti dei gruppi 2 e 3 svezzati a 22 giorni. Infatti, nel gruppo dei non trattati si evidenzia una produzione in IFN- α in 20 suinetti su 20, nel gruppo dei trattati in 18 soggetti su 20. La frequenza di risposta a 26 giorni dallo svezzamento rimane costante nel gruppo 1, mentre diminuisce nei gruppi 2 e 3 (Tabella 5).

Tabella 5: Numero di suini sul totale con presenza di IFN- α nel siero.

Gruppo suinetti	Giorno 0 (svezzamento)	Giorno + 6	Giorno + 26
1 svezzato a 28 g	1/19	7/19	7/19
2 svezzato a 22 g	1/20	20/20	1/20
3 svezzato 22 g +IFN- α	0/20	18/20	4/20

Number of IFN alpha- positive sera out of the total.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio svolto aveva come scopo quello di valutare le possibili alterazioni in senso pro-flogistico causate dallo svezzamento precoce nei suinetti in condizioni di campo e determinare l'eventuale ruolo di regolatore omeostatico di IFN- α somministrato agli animali *per os* a basso dosaggio.

La disregolazione della risposta flogistica allo *stress* è alla base delle alterazioni cliniche che sono normalmente osservate in questa fase del ciclo zootecnico, cui possono concorrere gli effetti di precarie condizioni igienico-sanitarie e di management aziendale.

I suini di questa prova sono stati allevati con elevati standard zootecnici, per cui i dati riportati sono da imputare esclusivamente al fattore svezzamento e non da concomitanti problemi clinici. Per quanto concerne le citochine analizzate in questo studio, TNF alfa e IL-6 sono fisiologicamente presenti a bassa concentrazione (<50 pg/ml) nel siero dei suini di diverse fasce di età (Amadori M., dati non pubblicati). IFN- α è invece fisiologicamente assente nel siero dei suini non sottoposti a *stress* di natura infettiva o non infettiva (Amadori M., 2007).

Con questo esperimento è stato confermato che il precoce allontanamento dalla madre (a 22 giorni) determina uno *stress* maggiore negli animali rispetto ad uno svezzamento più tardivo. A tale proposito, la cospicua risposta nei gruppi 2 e 3 in IFN- α e in TNF- α rispettivamente a +6 e +26 giorni dallo svezzamento dimostra come lo svezzamento a 22 giorni determini uno *stress* maggiore nei suinetti rispetto ad uno svezzamento più tardivo (28 giorni). I nostri dati confermano nel complesso il forte impatto in senso proflogistico causato dallo svezzamento precoce in accordo con i dati presenti in letteratura (Nabuurs M.J.A. *et al.* 1993, Piè S. *et al.* 2004, Zabielski *et al.* 2008). Sono state altresì approfondite le modalità di reazione omeostatica del suino a tale *stressor* ambientale e si è messo in luce il ruolo di IFN- α nella strategia adattativa dell'organismo.

I dati in nostro possesso mostrano che le differenze di accrescimento ponderale nei suini del gruppo 3 (trattato con IFN- α) rispetto a quelli del gruppo 2, non si

evidenziano a ridosso dello svezzamento, bensì a distanza di due-tre settimane; tale discrepanza non è invece evidente tra soggetti del gruppo 1 e 3 che a 47 giorni di vita raggiungono il medesimo peso medio. Pertanto, l'effetto positivo della somministrazione esogena di IFN- α si rende evidente a circa 26 giorni dallo svezzamento in concomitanza con la diminuzione della sua produzione endogena ed un deciso incremento del TNF- α sierico, assai maggiore nel gruppo 2 rispetto al gruppo 3. Questo dato conferma quanto già evidenziato nel modello suino SPF studiato in precedenza, dove la somministrazione di IFN- α *per os* migliorava la risposta omeostatica allo *stress* scatenato dallo svezzamento precoce. Risulta pertanto che la somministrazione esogena di IFN- α possiede un effetto positivo sui circuiti di regolazione delle citochine infiammatorie. Infatti, la maggiore risposta in IFN- α endogeno nei suini dei gruppi 2 e 3 rispetto ai soggetti del gruppo 1, induce a pensare che lo stress dello svezzamento precoce costringa i suini ad una maggiore risposta omeostatica compensativa; questa potrebbe essere in relazione anche con la maggiore immaturità dell'epitelio intestinale, che è sottoposto ad un cambiamento nell'assunzione dei nutrienti della dieta *starter*.

I dati zootecnici, seppur caratterizzati da un' ampia deviazione standard in alcuni gruppi, si prestano ad interessanti valutazioni che dovranno essere approfondite utilizzando in futuro gruppi sperimentali più numerosi. Il miglior accrescimento ponderale medio nei soggetti trattati con IFN- α potrebbe essere in parte determinato dalla differenza di peso presente tra i due gruppi prima dello svezzamento, tenendo presente che il peso medio delle nidiato allo svezzamento può essere predittivo dell'accrescimento futuro. Tale ipotesi non sembra però trovare conferma nell'analisi degli incrementi ponderali medi giornalieri nelle diverse settimane post svezzamento (tabella 2), da cui si evince che il deciso vantaggio a favore dei suinetti trattati si realizza nella terza settimana post svezzamento in relazione ad un miglior contenimento della risposta in TNF- α sierico (tabella 3). I risultati ottenuti indicano in sostanza che la somministrazione di IFN- α agevola la risposta omeostatica del suinetto agli *stressors* ambientali che si verificano allo svezzamento.

I risultati sopra riportati sono stati ottenuti nell'ambito del progetto finanziato dal Ministero della Salute, codice IZSLER PRC2005002.

Bibliografia

1. Amadori M., 2007. The role of interferon- α as homeostatic agent in the inflammatory response: a balance between danger and response? *J. IFN Cyt. Res.*, 27, 181-189
2. Asai, T., *et al.* 1993. Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 38:253-260.
3. Barnett K.L. *et al.* 1989. Characterization of creep feed consumption and its subsequent effects on immune response, scouring index and performance of weanling pigs. *J. Anim. Sci.*, 67, 2698-2708
4. Grenett, H.E., *et al.* 1991. Isolation and characterization of biologically active murine interleukin-6 produced in *Escherichia coli*. *Gene* 101:267-271.
5. Meager A. 1987. Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization. In: Clemens MJ, Morris AG, Gearing, AJH, eds. *Lymphokines and interferons, a practical approach*, Oxford: IRL Press Limited, 129-147.
6. Nabuurs M.J.A. *et al.* 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in The Netherlands. *Res. Vet. Sci.*, 55, 78-84
7. Piè S. *et al.* 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr.*, 134, 641-647
8. Zabielski *et al.* 2008. Control of development of gastrointestinal system in neonates. *J. Physiol. Pharmacol.*, 59, 35-54.