

# LIVELLI DI LIPOPOLISACCARIDI SIERICI SUPERIORI IN SUINI COLPITI DA FORME DI DIMAGRIMENTO E DEPERIMENTO NEL SETTORE SVEZZAMENTO

## *HIGHER SERUM LYPOPOLYSACCARIDES IN WEANED PIGLETS AFFECTED BY SYNDROMES OF WASTING*

CANDOTTI P., NASSUATO C., ROTA NODARI S.

*Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via Bianchi 9, Brescia;*

**Parole chiave:** suino, deperimento, endotossina, LPS, PCV2

**Key words:** pig, wasting, endotoxin, LPS, PCV2

### **Riassunto**

Per la prova sono stati selezionati 5 allevamenti di suini sani e 13 allevamenti che presentavano nel settore svezzamento una sintomatologia clinica attribuibile alla forma di deperimento multi sistemico post-svezzamento. In ogni allevamento sono stati eseguiti prelievi ematici in 10 suini allo svezzamento. I campioni ematici sono stati testati per evidenziare il livello di lipopolisaccaridi (LPS), Il-10 e TNF- $\alpha$ . I risultati hanno evidenziato che negli animali con sintomatologia da deperimento il livello di LPS ematici era più elevato rispetto agli animali clinicamente sani. L'aumento del livello degli LPS ematici potrebbe essere associato alla sintomatologia di deperimento osservata. In particolare, è stato stabilito un cut off di 0,44 EU/ml (sensibilità del 93% e specificità del 82%). Il-10 e TNF- $\alpha$  non sono risultati associati agli LPS.

### **Abstract**

Five healthy farms and 13 farms with a post-weaning multisystemic wasting syndrome were selected for the study. Ten weaners were blood sampled in each farm. Blood samples were tested for lipopolisaccarides (LPS), Il-10 and TNF- $\alpha$  level. Results showed that the animals with a wasting syndrome had a higher serum level of LPS compared with healthy animals. The higher level of LPS could be associated with the wasting syndrome observed. It was individuated a cut-off of 0,44 EU/ml (sensitivity of 93% and specificity of 82%). Il-10 and TNF- $\alpha$  were not associated with LPS levels.

### **Introduzione**

Nel 1996 nel Nord America viene descritta per la prima volta una sindrome caratterizzata dai segni clinici di deperimento nei suini nella fase post-svezzamento (Clark, 1997). Dopo tale segnalazione la sindrome è stata evidenziata in tutto il mondo con segni clinici molto variabili e caratterizzati da deperimento, forme respiratorie, aumento dei linfonodi inguinali superficiali, diarrea e deplezione linfocitaria generalizzata. Era frequente, inoltre, l'osservazione di infezioni secondarie da batteri opportunisti. La sindrome, a cui era stata attribuita la denominazione di PMWS (*Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome*) è stata recentemente rinominata PCVD (*Porcine Circovirus Disease*) (Opriessnig et al., 2007). Si ritiene che l'agente responsabile della malattia sia PCV2 (circovirus suino tipo 2) in associazione a potenziali fattori stimolanti in grado di innescare la sintomatologia clinica. Sperimentalmente la sindrome è stata riprodotta utilizzando diversi fattori scatenanti (tra i quali ad esempio l'inoculazione di Parvovirus suino, Allan et al., 1999)

ma nessuno di questi è risultato efficace e ripetibile nei suini convenzionali, anche se il fattore scatenante per la PMWS sembra essere un'alterazione del sistema immunitario indotta dallo stesso PCV2 o da un fattore scatenante (Fort et al., 2009).

In studi precedenti i lipopolisaccaridi (LPS) sono stati utilizzati per riprodurre le malattie respiratorie multifattoriali del suino, inocolandoli in associazione con il virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRS) o il coronavirus respiratorio del suino (PRCV) (Van Gucht et al., 2006). In questi studi è stato dimostrato che gli LPS hanno un effetto immunomodulatore, determinando una sovra espressione di alcune citochine, in particolare TNF- $\alpha$  (Van Reeth et al., 2000) correlato alla manifestazione clinica della malattia, mentre recentemente è stata evidenziata una up-regulation dell'IL-10 da parte del PCV2. Uno studio di Chang et al. (2006) ha dimostrato che gli LPS in vitro sono in grado di determinare una *up-regulation* della replicazione di PCV2 nei macrofagi polmonari di suino. Il loro effetto, tuttavia, non è stato ancora completamente chiarito. L'inoculazione, infatti, intramuscolare di LPS associata a infezione oronasale con PCV2 di suini CDCD (*Colostrum Deprived Cesarean Derived*) non è stata in grado di innescare la malattia (Fort et al., 2009). Le diverse specie animali presentano marcate differenze nella loro sensibilità alle endotossine e alla dose per loro necessaria per indurre il 100% della letalità (LD<sub>100</sub>). I suini, così come i ruminanti, sono estremamente sensibili alle endotossine, dal momento che dosaggi relativamente bassi di LPS (<5  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) sono in grado di determinare effetti marcati sul sistema cardiovascolare, in particolare sulla circolazione polmonare (Berczi et al., 1966; Olson et al., 1995). Sebbene il meccanismo preciso per il quale ciò avvenga non sia del tutto chiaro, è stato speculato che ciò possa essere dovuto alla presenza di macrofagi intravascolari che sono localizzati nella circolazione polmonare del suino.

La degradazione della parete dei batteri gram negativi determina il rilascio degli LPS nell'ambiente in cui i batteri si trovano al momento della loro disgregazione. Gram negativi presenti nel torrente circolatorio possono quindi dare origine alla circolazione degli LPS, ma questa non è la sola possibile fonte di ingresso delle endotossine. I lipopolisaccaridi, infatti, possono penetrare nel torrente circolatorio anche dalla sede polmonare, da quella enterica e da quella inalatoria (Michel, 2000). Negli allevamenti di suini, è presente molta polvere che proviene dalla cute, dal pelo, dalle feci e dall'alimento degli animali e in queste polveri possono essere presenti oltre a ife e spore fungine, micotossine e batteri, anche endotossine.

L'obiettivo del presente studio era quello di determinare i livelli sierici di LPS, IL-10 e TNF- $\alpha$  in suini allo svezzamento clinicamente sani e in suini allo svezzamento con una forma di deperimento clinicamente ascrivibile alla sindrome del deperimento multistemico post-svezzamento.

## Materiali e Metodi

Per lo studio sono stati selezionati 18 allevamenti di suini classificati in allevamenti clinicamente sani ("sani", n=5) e allevamenti con sintomatologia da deperimento allo svezzamento ("con sintomatologia", n=13).

La visita dell'allevamento è sempre avvenuta dopo un colloquio telefonico con il veterinario responsabile dell'allevamento, volto a chiarire lo status sanitario della categoria di animali interesse, ovvero animali "sani" o animali "con sintomatologia".

In allevamento è stata svolta un'indagine anamnestica in presenza dell'allevatore e del veterinario responsabile, in modo da poter valutare lo stato sanitario degli animali nei 6 mesi precedenti alla visita.

In una seconda fase si è proceduto a un'analisi clinica del settore svezzamento volto a verificare che gli animali da un punto di vista clinico rientrassero all'interno di una delle due classi e non fossero affetti da altre patologie.

In particolare, un allevamento è stato classificato "sano" quando l'anamnesi non rivelava alcuna patologia di origine infettiva, alimentare o gestionale nei 6 mesi precedenti alla visita, alla visita clinica veniva evidenziato un buono stato di salute e nei 3 mesi successivi alla visita non comparivano problemi sanitari in allevamento.

Un allevamento veniva definito "con sintomatologia" quando nel settore svezzamento erano presenti segni clinici tipici della sindrome del deperimento multisistemico post-svezzamento (deperimento, aumento dei linfonodi inguinali, diarrea, pallore, ittero, tosse, febbre, ulcera gastrica) ed eventualmente forme di PDNS e dopo che l'esame necroscopico eseguito su animali allo svezzamento avesse confermato il sospetto clinico per la presenza di polmonite interstiziale, aumento dei linfonodi inguinali ed eventuali lesioni associate (ulcera gastrica, enterite, ittero, etc.).

In ogni allevamento nel settore svezzamento sono stati selezionati 10 soggetti privi di lesioni esterne (infettive o traumatiche). Negli allevamenti "sani" sono stati selezionati soggetti sani con ottimo BCS (*Body Condition Score*). Negli allevamenti "con sintomatologia" sono stati selezionati animali con dimagrimento, deperimento, aumento marcato dei linfonodi inguinali ed eventuale pallore, ittero o febbre. In ogni animale è stato effettuato un prelievo ematico. Per il prelievo sono state utilizzate siringhe e aghi apirogeni e il sangue è stato trasferito, in campo, in una provetta di vetro resa apirogena mediante sterilizzazione a 180°C per 4 ore. Prima di procedere al prelievo ematico la cute dell'animale è stata sottoposta a pulizia e disinfezione con alcool 94°C denaturato. Il campione è stato trasportato in condizioni di refrigerazione fino al laboratorio dove è stato centrifugato per 20 minuti a una velocità di 3000 giri/minuto, poi stoccato a un'aliquota di 1500 $\mu$ L in provetta apirogena sterile BD Falcon™ da 5ml in polistirene a -80°C. Prima di procedere all'esecuzione del test Kinetic Cromogenic Assay secondo le indicazioni della ditta produttrice (Associates of Cape Cod Incorporated, 124 Bernard E. Saint Jean Drive, East Falmouth, MA 02536), i campioni sono stati inattivati a 60°C e filtrati con filtri Gelman 0.4 millimicron.

### **Analisi statistica**

L'effetto della condizione di malattia sul parametro di interesse LPS è stato indagato mediante un'analisi della varianza per misure ripetute applicando un modello lineare a effetti misti con la condizione di malattia, l'interleuchina 10 e il TNF- $\alpha$  come covariate. La variabile identificativa dell'allevamento è stata trattata come effetto random per tenere in considerazione l'eventuale correlazione tra le misure. Sono stati considerati indicativi di significatività statistica valori di p-value inferiori a 0.05.

L'individuazione del cut-off di LPS ai fini della predizione della condizione di malattia è stata effettuata mediante regressione logistica e analisi della curva ROC (Receiver Operating characteristic curve).

L'analisi statistica è stata effettuata con il software open-source R (versione 2.8.1).

### **Risultati**

In figura 1 viene riportata la media e l'intervallo di confidenza dei livelli di LPS evidenziati nei due gruppi esaminati.

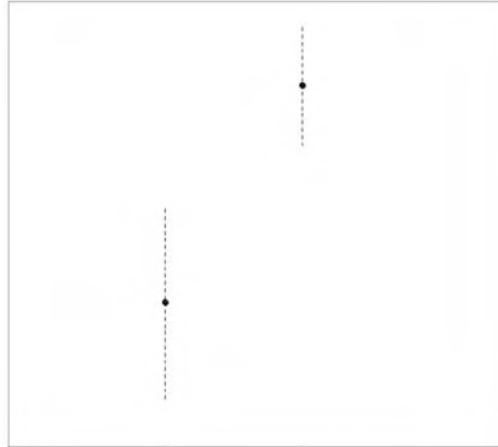


Figura 1. Livelli (media e I.C: 95%) di LPS nei due gruppi esaminati  
 Figure 1. Levels (mean and C.I.95%) of LPS in the two groups of treatment

La condizione di malattia è risultata significativamente associata a LPS. Il gruppo sano aveva in media un valore stimato di LPS pari a 0.34 (IC95%: 0.08-0.59) mentre nei malati il valore era di 0.92 (IC 95%: 0.76-1.08). In caso di malattia il valore di LPS risultava in media maggiore di 0.58 (CI 95%: 0.28-0.88;  $p < 0.001$ ). È stato individuato un valore di cut-off per gli LPS pari a 0.44.

In figura 2 viene riportato il modello di sensibilità-specificità costruito per l'individuazione del cut-off.

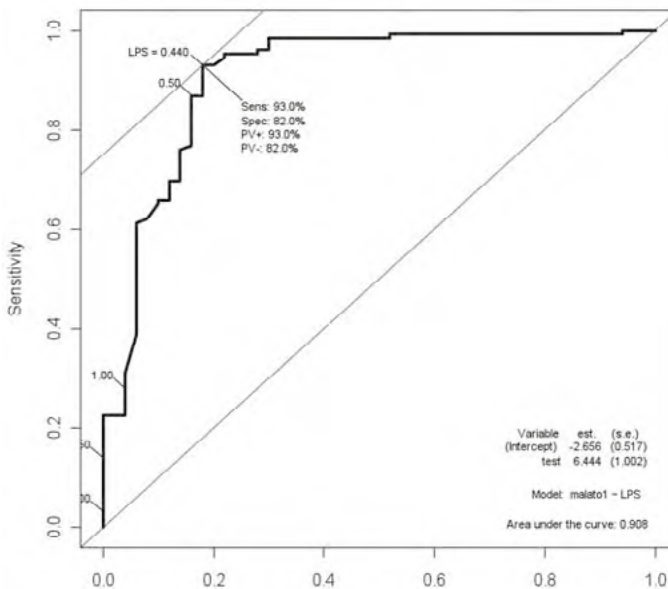


Figura 2. Modello per l'individuazione del cut-off.  
 Figure 2. Model for the cut-off construction.

## Discussione

I risultati hanno evidenziato livelli di LPS mediamente superiori negli animali affetti da deperimento rispetto agli animali sani. In particolare è stato possibile individuare un livello di cut-off di 0,44 EU/ml al di sopra del quale ritroviamo gli animali ammalati e al di sotto del quale i sani.

È evidente che la bontà dell'analisi è strettamente legata al disegno di studio e alla definizione degli animali veri positivi e veri negativi individuati attraverso il disegno sperimentale.

Il valore ottimale identificato è quello che massimizza Se e 1-Sp. Tuttavia la scelta del cut-off dipende dall'intendimento che si ha di evidenziare quanti più veri positivi possibili anche a discapito dei falsi positivi oppure no. Con il livello scelto la sensibilità è del 93% e la specificità del 82%.

I risultati riportati nel presente lavoro confermano analoghe ricerche degli autori (dati non pubblicati) dove, in allevamenti guariti da forme di deperimento multi sistemico post-svezzamento, animali sani del settore svezzamento presentavano livelli di LPS inferiori rispetto a quelli degli animali colpiti dalla malattia nel corso del focolaio. Gli effetti determinati dalla presenza degli LPS nel torrente circolatorio potrebbero spiegare fenomeni cardiovascolari e segni anatomopatologici di morte da shock in soggetti deceduti affetti da sindromi di deperimento. Nel presente studio la diagnosi e la definizione del focolaio di malattia da deperimento è stata ascritta genericamente alle forme di deperimento assimilabili alla PMWS da un punto di vista anamnestico, clinico e anatomopatologico, ma senza una diagnosi di certezza attraverso la valutazione della presenza di lesioni istologiche tipiche e la presenza in situ di PCV2. L'obiettivo del lavoro era, infatti, indagare la correlazione tra la presenza di deperimento multistemico non ascrivibile a cause zootecniche o a un patogeno specifico e il livello di LPS circolanti.

Non sorprende l'assenza di correlazione tra i livelli delle citochine studiate e il livello di LPS. L'andamento dei livelli di citochine ematiche è molto rapido ed è probabile che in animali non infettati sperimentalmente ma con infezione naturale il prelievo ematico sia avvenuto in momenti diversi della cascata di citochine, rendendo difficile una loro valutazione.

## Conclusioni

Il presente studio ha evidenziato livelli statisticamente più elevati di LPS nel torrente circolatorio negli animali colpiti da forme di deperimento rispetto ad animali clinicamente sani. Questi dati rappresentano i primi riscontri di campo relativamente allo studio delle endotossine circolanti nei suini e necessitano di ulteriori approfondimenti mirati a meglio chiarire il loro ruolo nelle dinamiche della malattia e nella induzione della morte nell'animale.

*La ricerca è stata finanziata con i fondi del Progetto di Ricerca Corrente 16/2004*

## Bibliografia

ALLAN G., KENNEDY S., MCNEILLY F., FOSTER J., ELLIS J., KRAKOWKA S., MEEHAN B. & ADAIR B. (1999) Experimental reproduction of severe wasting disease by co-infection of pigs with porcine circovirus and porcine parvovirus. *Journal of Comparative Pathology* 121, 1-11

BERCZI I., BERTOK L. & BEREZNAI T. (1966) Comparative studies on the toxicity of escherichia coli lipopolysaccharide endotoxin in various animal species. *Canadian Journal of Microbiology* 12, 1070-1071

CHANG H. W., PANG V. F., CHEN L. J., CHIA M. Y., TSAI Y. C. & JENG C. R. (2006) Bacterial lipopolysaccharide induces porcine circovirus type 2 replication in swine alveolar macrophages. *Veterinary Microbiology* 115, 311-319

CLARK E.G. (1997) Post-weaning multisystemic wasting syndrome. *Proc. Am. Assoc. Swine Practitioners* , 499-501

FORT M., FERNANDES L. T., NOFRARIAS M., DÍAZ I., SIBILA M., PUJOLS J., MATEU E. & SEGALÉS J. (2009) Development of cell-mediated immunity to porcine circovirus type 2 (PCV2) in caesarean-derived, colostrum-deprived piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 129, 101-107

MICHEL O. (2000) Systemic and local airways inflammatory response to endotoxin. *Toxicology* 152, 25-30

OLSON N., HELLYER P. & DODAM J. (1995) Mediators and vascular effects in response to endotoxin. *British Veterinary Journal* 151, 489-522

OPRIESSNIG T., MENG X. J. & HALBUR P. G. (2007) Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19, 591

RAVIN H., ROWLEY D., JENKINS C. & FINE J. (1960) On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal. *Journal of Experimental Medicine* 112, 783

VAN GUCHT S., LABARQUE G. & VAN REETH K. (2004) The combination of PRRS virus and bacterial endotoxin as a model for multifactorial respiratory disease in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 165-178

VAN GUCHT S., VAN REETH K. & PENSAERT M. (2003) Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: Potentiation of cytokine production and respiratory disease. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 960

VAN REETH K., NAUWYNCK H. & PENSAERT M. (2000) A potential role for tumour necrosis factor- $\alpha$  in synergy between porcine respiratory coronavirus and bacterial lipopolysaccharide in the induction of respiratory disease in pigs. *Journal of Medical Microbiology* 49, 613