

VALUTAZIONI PRELIMINARI DEGLI EFFETTI DEL LUNGO TRASPORTO SULLA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA DEL SUINETTO

IMPACT OF A LONG-DISTANCE JOURNEY ON INNATE IMMUNITY OF PIGLETS: A PRELIMINARY REPORT

RAZZUOLI E¹., CAFAZZO S²., MAGNANI D²., CALA' P²., DOTTI S¹., ARCHETTI IL¹.,
NANNI COSTA L²., AMADORI M¹.

*¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini" Sede di
Brescia, ²Facoltà di Agraria, Università di Bologna;
Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agro-alimentare*

Parole Chiave: suinetto, stress, trasporto, parametri immunologici

Keywords: piglet, stress, transport, immunological parameters

RIASSUNTO

Nell'ambito di un'ampia sperimentazione finalizzata a valutare la risposta del suinetto a trasporti di lunga durata (>8 ore), si riportano i risultati di una prova preliminare su 48 suinetti svezzati; di questi 36 sono stati sottoposti ad un viaggio di quindici ore e 12 hanno invece costituito il gruppo di controllo. I soggetti, mantenuti in uno stabulario sperimentale prima e dopo il trasporto, sono stati sottoposti a valutazioni periodiche dello stato clinico e ad una serie di prelievi di sangue a -2, 0, +5 e +15 giorni dal trasporto, al fine di valutare alcuni parametri immunologici (Lisozima, Aptoglobina, Complemento, Battericidia Sierica, Interleuchina-6, *Tumor Necrosis Factor- α* e Interferone- α). Durante la permanenza dei suinetti nello in stabulario si è provveduto alla registrazione della temperatura e dell'umidità al fine di valutare il microclima ambientale; è stata inoltre effettuata la registrazione degli stessi parametri sull'automezzo durante il trasporto. Nelle condizioni di viaggio esaminate i suinetti non hanno mostrato alcuna alterazione dei parametri clinici ed immunologici riferibile al trasporto. Le variazioni osservate tra i diversi prelievi hanno invece evidenziato una reazione di adattamento alle nuove condizioni di allevamento nello stabulario sperimentale, influenzata, a sua volta, dagli esiti di una forma diarroica manifestatasi nella fase antecedente al trasporto.

ABSTRACT

As part of a large-scale study designed to evaluate the response of piglets to long-distance transport, results of a preliminary test on 48 subjects, 36 transported for 15 hours and 12 rested as control, are reported. Piglets were reared for 28 days in an experimental piggery. They were subject to regular assessments of clinical status and to blood samplings at days -2, 0, +5 and +15 with respect to transport date. Serum samples were used to assess some immunological parameters (Lysozyme, Haptoglobin, Complement, Serum Bactericidal Activity, Interleukin-6, *Tumor Necrosis Factor- α* and Interferon- α). Temperature and relative humidity in the facility and in the vehicle during the journey were also recorded. Under

the travel conditions under study, the piglets did not show any clinical and immunological response to the transport treatment. The time-course of immunological parameters showed instead a link with the animals' adaptation to the new housing conditions in the experimental piggery and a diarrhoic syndrome occurred before transportation.

Introduzione

Il trasporto costituisce un fattore di stress ben noto per gli animali di interesse zootecnico. Esso si configura come un'operazione assai complessa, articolata in fasi distinte di carico, trasporto vero e proprio, scarico in azienda o nelle aree di sosta annesse agli impianti di macellazione. In tali fasi agiscono sugli animali fattori stressogeni di natura fisica e psico-neuro-immunologica che possono predisporre all'insorgenza di patologie diverse e variegata (Broom, 2005). E' evidente che l'influenza di questi fattori può essere tanto più rischiosa per la salute degli animali quanto più sono in giovane età. I principali meccanismi fisiopatologici e comportamentali di risposta allo stress da trasporto sono ormai ben noti. In questo ambito, la ricerca scientifica ha approfondito 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* ambientali, sia di origine infettiva che non infettiva (Amadori M., 2007). In tale contesto, lo scopo di questo lavoro preliminare è stato quello di valutare l'effetto del lungo trasporto, effettuato in condizioni microclimatiche controllate, sulla capacità di recupero omeostatico e sulla risposta immunitaria innata dei suinetti.

Materiali e Metodi

1.1 Animali

Il protocollo sperimentale è stato preventivamente approvato dal Comitato Etico dell'Università di Bologna nell'ambito di una sperimentazione più ampia sul trasporto dei suinetti di cui il presente lavoro costituisce la parte iniziale.

In un allevamento di suini a ciclo chiuso sono stati selezionati 48 soggetti [Duroc x (Landrace x Large White)] bilanciati per sesso e nati da parti contemporanei. A 10 giorni di vita tutti gli animali sono stati identificati tramite marca auricolare e sottoposti ad una valutazione clinica generale, al fine di escludere i soggetti con stati patologici, che potessero influenzare negativamente l'esito della sperimentazione.

1.2 Piano sperimentale

All'età di 35 giorni, nel mese di maggio del 2009, i suinetti sono stati trasferiti nello stabulario del Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare dell'Università di Bologna ove, dopo un periodo di adattamento (7 giorni), sono stati suddivisi in due gruppi: gruppo C (Controllo) formato da 12 soggetti e il gruppo T (Trasporto) formato da 36 soggetti. I suinetti del gruppo T sono stati sottoposti ad un viaggio della durata di 15 ore, durante il quale l'automezzo ha percorso un itinerario circolare, con partenza ed arrivo allo stabulario, transitando inizialmente in Pianura Padana, proseguendo con l'attraversamento dell'Appennino e l'arrivo sulla costa del Mar Tirreno per poi rientrare in Pianura Padana. Il trasporto è stato effettuato in conformità con le norme previste dal Reg. UE n. 1/2005. Nei quindici giorni successivi al trasporto è stato monitorato lo stato sanitario degli animali che, al termine di tale periodo, sono stati riconsegnati all'allevamento di provenienza. Durante l'esperimento si è provveduto a monitorare tramite sonde (HOBO Pro v2 Data Logger), la temperatura e umidità relativa sia sul camion che in allevamento.

1.3 Prelievi ed analisi di laboratorio

Ogni soggetto è stato sottoposto ad un prelievo di sangue, in provette prive di anticoagulante, a 2 giorni dal trasporto (T-2), dopo una settimana dall'ingresso in stabulario, subito dopo il trasporto (T0), a 5 giorni (T+5) e a 15 giorni (T+15) dal trasporto. Il campione di sangue è stato conservato a temperatura ambiente per 2 ore e successivamente centrifugato a 4°C per 15 minuti a 2000 rpm; in seguito è stato raccolto sterilmente il siero, conservato in aliquote a -80°C. Su tali campioni, sono state valutate le concentrazioni di Aptoglobina (Kit Phase Haptoglobin, Celbio, cod. TP 80), complemento emolitico (Seyfarth 1976), Lisozima (Osserman e Lawlor, 1966), battericidia sierica (Dorn et al., 1980) e di alcune importanti citochine: *Tumor Necrosis Factor* (TNF)- α (Asai et al. (1993), Interleuchina-6 (IL-6) (Grenett et al. 1991), Interferone (IFN)- α (Meager, 1987).

1.4 Analisi statistica

Si è provveduto a valutare preliminarmente la normalità delle distribuzioni per i valori ottenuti per i parametri immunologici esaminati. I valori sono stati normalizzati con l'elevazione al quadrato per la Battericidia e con la trasformazione in logaritmo per Lisozima, Complemento ed Aptoglobina. I dati sono stati poi elaborati mediante la procedura Mixed del programma SAS (SAS, 1996) impiegando un modello per analisi ripetute che ha incluso come fattore random il soggetto e come fattori fissi il prelievo, il trasporto e la rispettiva interazione. Quest'ultima non è mai risultata statisticamente significativa ($P>0.05$) e pertanto è stata esclusa dal modello. I tre gradi di libertà del fattore "prelievo" sono stati ripartiti in altrettanti confronti ortogonali finalizzati alla valutazione delle differenze tra prelievi successivi (T-2 vs T0, T0 vs T+5, T+5 vs T+15). Per i dati relativi alle analisi delle citochine TNF- α e IL-6 sono stati calcolati i valori corrispondenti al 75mo percentile, mentre per l'IFN- α è stata registrata la sua presenza/assenza.

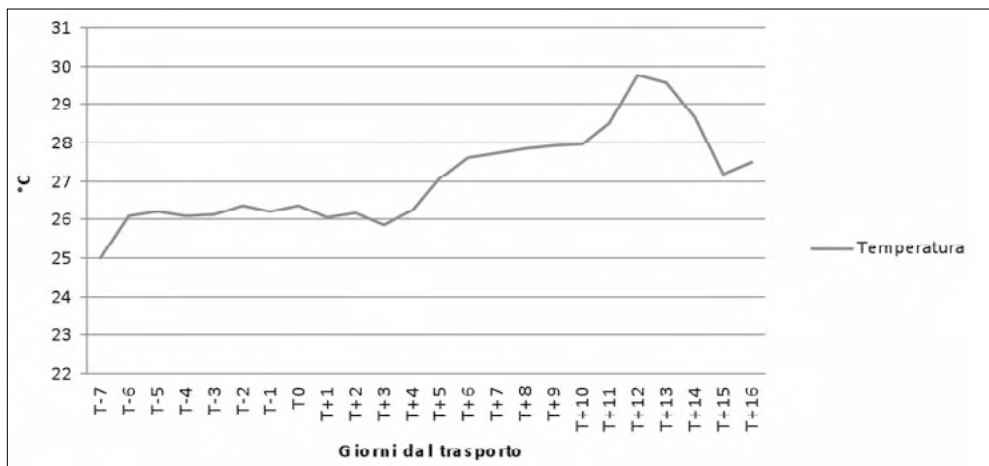
Risultati

Lo stato sanitario degli animali non è risultato ottimale successivamente all'entrata in stabulario. Infatti molti suinetti hanno presentato diarrea in assenza di rialzo febbrile nella prima settimana di permanenza nel nuovo ambiente (settimana di adattamento).

Le condizioni climatiche nelle quali è stata effettuata la prova sono descritte nelle Figure 1, 2, 3, e 4. I valori di temperatura registrati nello stabulario si sono collocati nei *range* di termoneutralità per i suinetti (Fig 1).

Fig 1: Andamento della temperatura (C°) media alle ore 12 nello stabulario.

Time-course of mean temperature (°C) at 12 o'clock in the piggery



Il rilievo dell'umidità relativa in stabulario (Fig 2) indica che i valori medi minimi ($50,06 \pm 7,08$) e massimi ($68,35 \pm 10,35$) si rilevano, rispettivamente, a 14 e 16 giorni dal trasporto

Fig 2: Andamento dell'umidità relativa (%) media alle ore 12 nello stabulario
Time-course of mean relative humidity (%) at 12 o'clock in the piggery



Anche l'andamento registrato durante il trasporto di queste due variabili non ha mostrato aspetti particolari (Fig 3 e 4).

Fig 3: Valori di temperatura (°C) rilevati durante il trasporto su camion ed in allevamento
Temperatures (°C) during truck transportation (camion) and in the piggery (sala)

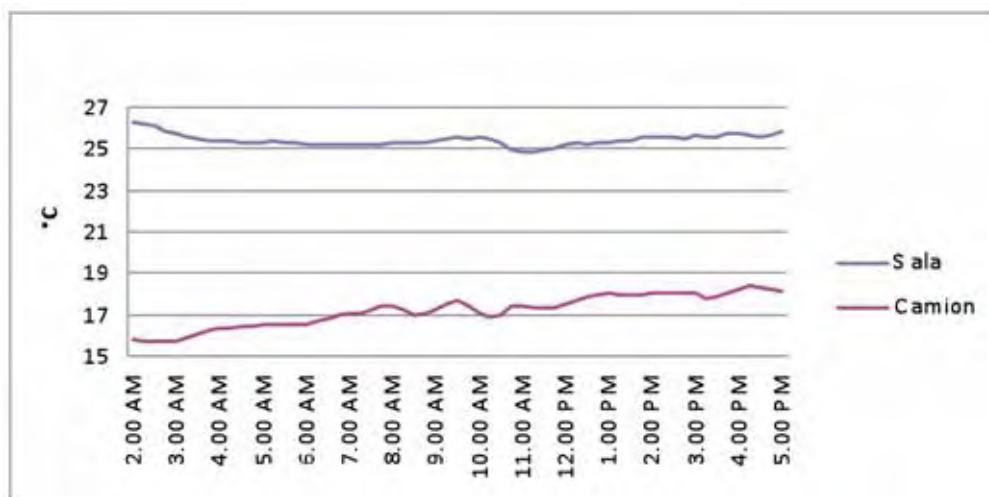
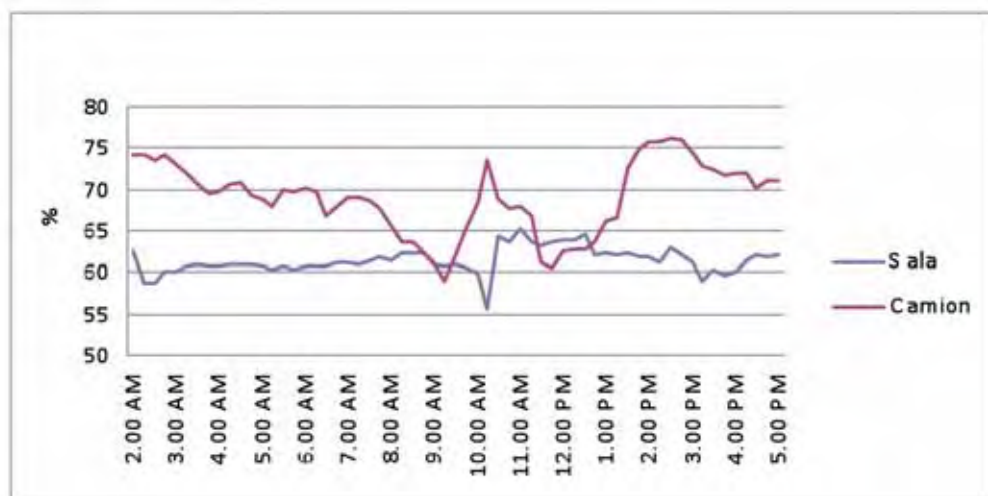


Fig 4: Valori di Umidità Relativa (%) rilevati durante il trasporto nel camion ed in allevamento.
Relative humidity (%) during truck transportation (camion) and in the piggery (sala)



L'analisi statistica dei dati relativi ai parametri immunologici ha evidenziato che il fattore tempo ha esercitato un'influenza statisticamente significativa sui valori di Lisozima, Complemento, Aptoglobina e Battericidia, mentre non è emerso alcun effetto significativo attribuibile al fattore trasporto, sia considerato da solo che in relazione con il tempo di prelievo. La tabella 1 (Tab 1) riporta il valore medio e la deviazione standard per i diversi tempi di prelievo, senza considerare la suddivisione nei gruppi Trasporto e Controllo; la significatività dei confronti T-2 vs T0, T0 vs T+5, T+5 vs T+15 si riferisce ai valori trasformati.

Al fine di evidenziare l'assenza dell'effetto del trasporto sui parametri immunologici, nella tabella 2 (Tab 2) sono riportati i valori medi e la deviazione standard dei suddetti parametri nei soggetti trasportati e non trasportati ai diversi tempi di prelievo. Dal suo esame emerge, per tutti i parametri, la piena corrispondenza degli andamenti tra i due gruppi in ciascuno dei prelievi effettuati.

Tab 1. Valori medi (\pm deviazione standard) dei parametri immunologici ai diversi prelievi.
Mean values (\pm standard deviation) of immunological parameters at different sampling time

Parametri	Unità di Misura	T-2	T0	T+5	T+15
Lisozima	$\mu\text{g/ml}$	$7,47 \pm 2,41$ a	$5,52 \pm 1,94$ b	$4,75 \pm 0,98$ b	$6,82 \pm 1,90$ a
Aptoglobina	mg/ml	$1,48 \pm 0,77$ a	$1,03 \pm 0,80$ b	$0,58 \pm 0,65$ a	$1,08 \pm 0,71$ b
Complemento	$\text{C}'\text{H}_{50}/100$ μl	$48,27 \pm 27,82$ a	$83,53 \pm 41,24$ b	$64,66 \pm 12,34$ a	$78,85 \pm 27,33$ b
Battericidia	%	$53,85 \pm 7,09$ a	$61,54 \pm 5,94$ b	$51,62 \pm 5,44$ a	$50,17 \pm 6,56$ a

Lettere diverse indicano differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$).
Different alphabet letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Tab 2: Valori medi (\pm deviazione standard) dei parametri immunologici ai diversi tempi di prelievo per i gruppi Controllo e Trasporto.
Mean values (\pm standard deviation) of immunological parameters at different sampling time for group C and T.

Parametri	Unità di Misura	T-2	T0	T+5	T+15
Lisozima (Controllo)	$\mu\text{g/ml}$	6,78 \pm 2,26	5,40 \pm 1,30	4,98 \pm 0,96	7,22 \pm 2,10
Lisozima (Trasporto)	$\mu\text{g/ml}$	7,71 \pm 2,45	5,68 \pm 2,09	4,67 \pm 0,99	6,69 \pm 1,84
Aptoglobina (Controllo)	mg/ml	1,47 \pm 0,53	1,14 \pm 0,89	0,36 \pm 0,35	1,02 \pm 0,75
Aptoglobina (Trasporto)	mg/ml	1,48 \pm 0,84	1,00 \pm 0,78	0,65 \pm 0,71	1,09 \pm 0,71
Complemento (Controllo)	C'H ₅₀ /100 μl	43,9 \pm 27,41	88,60 \pm 65,27	57,9 \pm 8,85	83,1 \pm 33,67
Complemento (Trasporto)	C'H ₅₀ /100 μl	52,1 \pm 27,49	81,8 \pm 30,5	66,9 \pm 12,61	77,4 \pm 25,27
Battericidia (Controllo)	%	53,83 \pm 6,94	61,25 \pm 7,25	52,83 \pm 5,51	52,75 \pm 4,45
Battericidia (Trasporto)	%	53,86 \pm 7,25	61,64 \pm 5,43	51,22 \pm 5,43	49,31 \pm 6,96

I livelli sierici medi di Lisozima si sono collocati al di sopra del limite di 5 $\mu\text{g/ml}$ considerato il valore di riferimento per i soggetti della categoria zootecnica considerata (http://www.izsler.it/izs_bs/ftp//doc/CREF%20Benessere%20animale/Attivita/Immunologia_clinica/Biochimica1.pdf). I valori di tale parametro hanno mostrato una significativa diminuzione dal primo al secondo prelievo, a cui è seguito un ulteriore decremento in corrispondenza del terzo ed un incremento significativo da quest'ultimo al quarto. Un analogo andamento è emerso anche per l'Aptoglobina i cui livelli medi sono risultati tutti compresi entro il nostro *range* di riferimento di 0,2 – 2 mg/ml. Le variazioni dei dati medi del Complemento tra i diversi prelievi sono risultate tutte statisticamente significative. I valori sono aumentati significativamente dal primo al secondo prelievo per poi successivamente ridursi ed infine ritornare a crescere in corrispondenza del quarto prelievo. Fatta eccezione per il primo prelievo i valori medi di tale parametro son rimasti al disopra del limite di riferimento pari a 50 C'H₅₀/100 μl (Moscati et al. 2003). La Battericidia ha mostrato valori medi tutti superiori al 40%, considerato il limite inferiore di riferimento presso il nostro laboratorio (http://www.izsler.it/izs_bs/ftp//doc/CREF%20Benessere%20animale/Attivita/Immunologia_clinica/Biochimica1.pdf). L'andamento di questo parametro è risultato analogo a quello del complemento fino a 5 giorni dopo il trasporto; tra T+5 e T+15 non ha subito variazioni significative contrariamente a quanto osservato per il complemento.

Nella tabella 3 (Tab 3) sono riportati i valori di 75mo percentile delle Citochine TNF- α , IL-6 ed i casi di positività per IFN- α , suddivise per i gruppi Controllo e Trasporto.

Tab 3: Valori di sierici delle citochine saggiate; viene riportato il valore (in pg/ml) che corrisponde al 75° percentile della distribuzione
Concentrations of cytokines in pig sera. Results are expressed as 75th percentile values

Parametri	Unità di Misura	T-2	T0	T+5	T+15
IL-6 (Controllo)	pg/ml	1775,75	1694,35	1894,25	3342,67
IL-6 (Trasporto)	pg/ml	2339,00	2645,80	1976,50	3802,0
TNF- α alfa (Controllo)	pg/ml	827,75	3255,25	463,75	665,25
TNF- α (Trasporto)	pg/ml	1081,30	1832,00	459,00	957,0
IFN- α (Controllo)	Presenza/N° Totale Animali	2/12	2/12	0/12	0/12
IFN- α (Trasporto)	Presenza/N° Totale Animali	6/36	6/36	2/36	0/36

I risultati ottenuti dai saggi citochinici evidenziano che in entrambi i gruppi vi è stata una risposta in IL-6 e TNF- α estremamente elevata rispetto alla soglia fisiologica dei 150 pg/ml (Amadori, dati non pubblicati) durante tutto il periodo di osservazione. Per quanto concerne la produzione di IFN- α endogeno, la risposta nei due gruppi è risultata perfettamente sovrapponibile nei primi due prelievi, con eguale percentuale di positivi. Successivamente, la frequenza di risposta positiva al terzo prelievo si è abbassata in entrambi i gruppi per poi azzerarsi in corrispondenza del quarto.

Discussione

I dati ottenuti indicano che sia la temperatura che l'umidità relativa rilevate in stalla sono risultate prossime ai valori considerati ideali per la categoria zootecnica testata.

Durante il trasporto la temperatura si è collocata, in media, appena al di sotto del limite critico per la categoria di animali trasportati (EFSA, 2004). Come atteso, si è registrato un suo regolare incremento dalle prime ore del mattino a quelle di metà pomeriggio, causato dall'innalzamento della temperatura ambientale esterna. Le variazioni di umidità relativa durante il tempo di trasporto sono state particolarmente evidenti ed attribuibili al cambiamento delle condizioni climatiche esterne delle zone attraversate dall'automezzo.

La prova svolta ha evidenziato l'assenza di un effetto attribuibile al trasporto sui parametri immunologici saggiati; infatti sia i soggetti trasportati che quelli di controllo hanno mostrato andamenti quasi sovrapponibili nell'evoluzione della concentrazione sierica di Lisozima, Aptoglobina, Complemento, Battericidia (parametri di immunologia clinica) e dei livelli citochinici. Si tenga presente a tale proposito che i parametri di immunologia clinica sono idonei a rappresentare l'impatto di *stress* a carattere subacuto-cronico, della durata di giorni o settimane. I dati vanno pertanto analizzati in un opportuno arco temporale. In particolare, i valori persistentemente elevati di Lisozima sono probabilmente riferibili alle conseguenze della sintomatologia diarroica manifestatasi nei giorni antecedenti al trasporto.

Complemento e Battericidia hanno presentato, sia nel gruppo Controllo che in quello Trasporto, i valori più elevati al secondo prelievo ed un significativo decremento (all'interno però del *range* normo-fisiologico) al terzo prelievo, in funzione probabilmente della reazione di adattamento alle nuove condizioni ambientali caratterizzate tra l'altro da cospicue variazioni di temperatura ed umidità relativa dopo il trasporto (Fig. 1 e 2).

I risultati ottenuti dai saggi citochinici evidenziano un'elevata risposta sia in IL-6 che in TNF- α prima del trasporto, con concentrazioni superiori ai livelli fisiologici in ambedue i gruppi,

riferibili, con buona probabilità alle conseguenze della sintomatologia diarroica sopra ricordata. A tale condizione si sovrappone la fisiologica regolazione dei livelli di citochine nella fase post-svezzamento, correlata al pieno adattamento al nuovo regime alimentare e ai corrispondenti livelli di accrescimento ponderale (Candotti et al., 2009). Per quanto concerne la produzione di IFN- α , la risposta nei due gruppi è risultata perfettamente sovrapponibile nei primi due prelievi, con eguale percentuale di campioni positivi. Successivamente, la frequenza di risposta positiva al terzo campionamento si è abbassata in entrambi i gruppi per poi azzerarsi in corrispondenza del quarto. Si tenga presente che IFN- α è fisiologicamente assente nel siero di suini non sottoposti a stress di natura infettiva o non-infettiva (Amadori, 2007).

Conclusioni

I risultati ottenuti in questa prova preliminare permettono di concludere che il trasporto di lunga durata di suinetti nel rispetto delle norme stabilite dal Reg. 1/2005 non determina, nelle condizioni microclimatiche testate, alterazioni evidenti della risposta immunitaria innata. Ulteriori prove di trasporto effettuate in condizioni climatiche differenti potranno contribuire a chiarire l'effetto di stress non infettivi (trasporto) sulla risposta immunitaria innata del suino.

Bibliografia

Amadori M. (2007) "The role of IFN- α as homeostatic agent in the inflammatory response: a balance between danger and response?" *J Interferon Citokine Res.* **27**, 181-189.

Asai T., Okada M., Ono M., Irisawa T., Yokomizo Y., Sato S. (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.

Candotti P., Rota Nodari S., Razzuoli E., Dotti S., Amadori M. (2009) "Verifica degli effetti flogistici dello svezzamento precoce nel suinetto e loro modulazione mediante somministrazione di interferon-alfa." *Atti XXXV Meeting Annuale SIPAS, Modena 12-13 Marzo*, 293-299.

Dorn W., Mehlhorn G., Klemm C. (1980) "Blood bactericidal activity in calves." *Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin.* **34**, 635-650.

EFSA (2004) "Standards for the microclimate inside animal road transport vehicles". *The EFSA Journal* (2004), **122**, 1-25.

Grenett HE., Danley DE., Strick CA., James LC., Otterness IG., Fuentes N., Nesbitt JE., Fuller GM. (1991) "Isolation and characterization of biologically active murine interleukin-6 produced in *Escherichia coli*." *Gene.* **101**, 267-271.

Moscato L., Stelletta C., Sensi M., Sonaglia L., Battistacci L. (2003) "Studio di alcuni parametri immunologici per la valutazione dello stato di benessere nell'allevamento del suino all'ingrasso". *Atti V° Congresso Nazionale S.I.Di.L.V, Pisa 20-21 Novembre*, 103-104.

Meager A. (1987) "Quantification of interferons by anti-viral assays and their standardization." In: Clemens MJ, Morris AG, Gearing, AJH. "Lymphokines and interferons, a practical approach" Oxford: IRL Press Limited, 129-147.

Osserman E.F., Lawlor D.P. (1966) "Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia." *J Exp Med.* **124**, 921-952.

SAS (1996). *SAS/STAT User's Guide*, 4th Ed., SAS Institute Inc., Cary, NC.

Seyfarth M. (1976) "Komplementtitration" In: "Immunologische Arbeitsmethoden" Ed: H. Friemel. VEB Gustav Fischer Verlag, 145-148.