

EFFETTO DELL'ETÀ E DEL SESSO SU ALCUNI PARAMETRI EMATICI CORRELATI ALLO STRESS IN SUINI PESANTI ALL'INGRASSO

AGE AND GENDER EFFECT ON SOME BLOOD PARAMETERS RELATED TO STRESS IN FATTENING HEAVY PIGS

DI MARTINO G.¹, STEFANI A.¹, GOTTARDO F.², SCOLLO A.², SCHIAVON E.¹, CAPELLO K.¹, BONFANTI L.¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie;*

² *Dipartimento di Scienze Animali, Università degli Studi di Padova*

Parole chiave: età, genere, suino pesante, aptoglobina, cortisolo, rapporto albumina globuline.
Key words: age, gender, heavy pig, haptoglobin, cortisol, albumin to globulin ratio.

Riassunto. In un sito di ingrasso di suini commerciali per la produzione del suino pesante italiano è stato monitorato un ciclo di 210 giorni di 366 maschi castrati e 366 femmine. Sono stati quantificati attraverso 2 prelievi ematici a 122 e 274 giorni di età, ciascuno su 72 maschi castrati e 72 femmine, i livelli sierici di aptoglobina, albumina, globuline e cortisolo. I parametri considerati non hanno evidenziato chiari effetti correlati all'aumento dell'età degli animali e non hanno superato valori considerati fisiologici. I soggetti di sesso femminile hanno evidenziato a fine ingrasso valori di aptoglobina statisticamente superiori rispetto ai maschi castrati, non correlati all'innalzamento degli altri parametri di stress: ciò sembra essere dovuto alla presenza di un effetto sesso in tale sieroproteina non legato allo stress. La quantificazione della pig-MAP, inizialmente inserita nel protocollo di monitoraggio, è stata poi esclusa a causa di una insufficiente ripetibilità e riproducibilità del metodo seguito.

Abstract. A fattening cycle of 210 days of 366 castrated males and 366 females for the production of Italian heavy pig was monitored into an open-site commercial farm. Serum haptoglobin, albumin, globulins and cortisol level were quantified through 2 blood sampling at 122 and 274 days of age, each one on 72 castrated males and 72 females. Analysed parameters didn't highlight clear effect related to animal age and didn't exceed values considered physiological. Females evidenced haptoglobin values statistically higher than males at the end of the fattening period, not related to the increase of the other stress parameters: this fact seems to be due to the presence of a gender effect in this seroprotein not linked to stress. Pig-MAP quantification, at the first instance enclosed in the monitoring protocol, was then excluded because of unacceptable reproducibility and repeatability characteristics of the adopted method.

INTRODUZIONE

Nella valutazione del benessere della specie suina stanno riscuotendo interesse crescente quei parametri di tipo fisiopatologico che possono rivelarsi non solo marker precoci dell'insorgenza di patologie (esprimibili in termini di flogosi subclinica), ma anche indicatori di condizioni di allevamento non adeguate.

L'aptoglobina (Hp), ad esempio, è una glicoproteina la cui funzione primaria è quella di legare l'emoglobina libera nel sangue (Kaneko, 2008), ma è anche stata riconosciuta come la principale proteina di fase acuta (AAP) nei ruminanti (incremento di 10-100 volte in

risposta allo stimolo) e nel suino (incremento di 2-10 volte) (Murata *et al.*, 2004). In questa specie l'aumento di Hp è stato dimostrato essere associato a segni clinici di patologie podali e respiratorie, morsicatura delle code, necrosi delle orecchie, lesioni croniche rilevate in fase di macellazione (Petersen *et al.*, 2004; Salamano *et al.*, 2008; Heinonen *et al.*, 2010). Anche la pig-MAP secondo studi recenti sembra essere, assieme all'aptoglobina, un altro promettente parametro indicatore di stress, in quanto mostra aumenti anche di più di 10 volte nel corso flogosi iatrogene, traumi e infezioni (Piñeiro *et al.*, 2009).

L'albumina (Alb) rappresenta la componente maggiore delle proteine plasmatiche, è essenziale per regolazione e mantenimento della pressione colloidale-osmotica del sangue ed è coinvolta nel trasporto di metaboliti. È sintetizzata nel fegato e la sua concentrazione plasmatica può risultare diminuita nel corso di epatopatie, nefropatie, parassitosi e patologie infiammatorie croniche (Kaneko *et al.*, 2008). La frazione delle globuline (Glo) va incontro ad un aumento in presenza di patologie infettive e processi infiammatori, ad una diminuzione nel corso di stati immunodepressivi (Kaneko *et al.*, 2008). Il rapporto albumina/globuline (rapporto A/G) risulta pertanto un importante parametro fisiologico di stress, in quanto il suo decremento è spesso associato a patologie infiammatorie e rappresenta la cosiddetta risposta di fase acuta (Kaneko *et al.*, 2008).

Il livello di cortisolo sierico, pur presentando notevoli variazioni in base al ritmo circadiano, con picchi massimi nel pomeriggio (Evans *et al.*, 1988), è un ormai consolidato parametro di valutazione di condizioni di stress nel suino, essendo il principale glucocorticoide secreto (Bottoms *et al.*, 1972). Studi più recenti che hanno indagato maggiormente la sua concentrazione salivare hanno evidenziato variazioni legate anche all'età e al genere (Ruis *et al.*, 1997).

Le informazioni relative alle condizioni di stress subito dai suini che sono ricavabili dai suddetti parametri devono tuttavia essere valutate in base a intervalli di riferimento che considerino il genere e l'età degli animali, aspetti potenzialmente rilevanti in relazione alla biochimica clinica ancora poco studiata del suino pesante italiano. L'obiettivo di questo lavoro è stato pertanto quello di individuare dei valori medi per alcuni parametri ematici in relazione al sesso e alla fase di ingrasso.

MATERIALI E METODI

Animali e strutture

La ricerca, della durata di 30 settimane, ha impiegato 672 suini ibridi commerciali (366 maschi castrati e 366 femmine) provenienti dallo stesso sito di svezzamento ed accasati a 80 giorni di età presso il medesimo capannone di ingrasso in 24 box unisessuali di 28 capi con pavimentazione in cemento parzialmente grigliato (28.6 m²), più parquet esterno in grigliato. L'alimentazione era di tipo liquido in un trogolo di lunghezza tale da garantire 40 cm/capo. L'acqua di bevanda era sempre a disposizione degli animali attraverso la presenza di un abbeveratoio per ogni box. Ciascun box presentava inoltre quali arricchimenti ambientali una catena in metallo e una ricoperta da gomma. Il controllo sanitario degli animali veniva effettuato 2 volte al giorno da personale adeguatamente formato in corrispondenza della distribuzione dei pasti.

Prelievi ematici e metodiche di laboratorio

I prelievi sono stati effettuati a 122 e 274 giorni di età dei suini. Da ciascun box sono stati scelti casualmente 6 capi, effettuando quindi complessivamente 72 prelievi tra i maschi castrati e 72 tra le femmine in corrispondenza di ciascuna età. Il sangue è stato prelevato dalla vena giugulare utilizzando provette sottovuoto da 10 ml (Vacutest Kima srl, Arzèrgrande, PD, Italia). Il siero è stato ottenuto attraverso centrifugazione a 2500g per

10 minuti a 20°C.

La concentrazione di Hp sierica è stata determinata attraverso kit commerciale ELISA (Phase Haptoglobin, Tridelata Development Ltd, Maynooth, County Kildare, Irlanda), sulla base del metodo proposto da Petersen *et al.* (2001). La percentuale delle frazioni proteiche è stata determinata attraverso elettroforesi automatizzata (Hydrasis LC, SEBIA, EVRY Cedex, Francia) su gel di agarosio allo 0,8% (Hydrigel 30 Protein, SEBIA, EVRY Cedex, Francia). Per determinare la concentrazione di albumina e globuline le proteine totali del siero sono state quantificate con analizzatore automatizzato (BM Hitachi 911, ROCHE, Basel, Svizzera) attraverso kit colorimetrico con reagente di Biureto (TP, ROCHE, Basel, Svizzera).

Il cortisolo è stato determinato mediante metodica immunologica in chemiluminescenza utilizzando un kit commerciale applicato a strumentazione automatizzata Immunlite One (Medical System, Italia).

La pig-MAP è stata valutata attraverso il metodo proposto da Piñeiro M. *et al.* (2009) utilizzando un kit ELISA (PigMAP kit ELISA, PigCHAMP Pro Europa S.A.).

Analisi statistica dei dati

E' stata valutata la normalità delle distribuzioni dei parametri osservati tramite il test di Saphiro-Francia e si è proceduto alla normalizzazione dei dati nei casi in cui l'assunto non era verificato. L'elaborazione statistica è stata condotta attraverso un'analisi della varianza per modelli misti, separatamente per momento di prelievo e considerando il box come effetto random. I dati sono presentati come media e deviazione standard. L'analisi è stata realizzata utilizzando il software statistico STATA versione 9.2.

RISULTATI

Nonostante l'accuratezza con cui è stato effettuato il prelievo, un numero seppur esiguo di campioni di siero ha presentato un evidente stato di emolisi, venendo quindi escluso dal data set. Tale fenomeno potrebbe infatti inficiare la quantificazione di diversi parametri, tra cui la stessa Hp come è stato evidenziato da Petersen *et al.*, 2001.

La percentuale di campioni eliminati è stata quindi pari all'8.3% a 122 giorni mentre è stata dell'1.4% a 274 giorni.

In tabella 1 sono riportati i dati medi dei diversi parametri considerati stratificati per sesso ed età. A 122 giorni non si sono registrate differenze significative nella concentrazione di Hp tra maschi castrati e femmine. A 274 giorni le femmine presentano concentrazioni quasi due volte superiori rispetto ai maschi, pur rimanendo all'interno del *range* fisiologico indicato da Kaneko, *et al.* (2008).

I livelli medi di albumina sierica, globuline totali e rapporto A/G, stratificati per sesso ed età, non differiscono in modo significativo tra maschi castrati e femmine nei 2 prelievi. I valori di albumina ricadono nell'intervallo riportato da Kaneko *et al.* (2008), mentre le globuline mostrano valori complessivi lievemente inferiori rispetto al *range* proposto dallo stesso autore, ma sono maggiori di quelli misurati da Hicks *et al.* (1998) durante la fase di svezzamento.

Analogamente a quanto osservato per le frazioni proteiche del siero, i livelli medi di cortisolo stratificati per sesso ed età non evidenziano differenze tra gruppi nei due prelievi. In media i valori ricadono entro l'intervallo fisiologico (27-355 nmol/l) riportato da Kaneko *et al.* (2008).

La concentrazione di PigMAP sierica non è stata determinata a causa di valori di ripetibilità (n = 20, CV > 20%) e riproducibilità (n = 10, CV > 20%) troppo elevati ottenuti utilizzando il metodo ELISA: tali caratteristiche non consentono di confermare la validazione della metodica secondo i dati pubblicati in letteratura.

Tabella 1. Concentrazione sierica (media e deviazione standard) di Hp, Alb, Globuline (g/l), rapporto A/G e cortisolo in suini all'ingrasso maschi castrati e femmine a 122 e 274 giorni di età.

Table 1. Serum concentration (mean and standard deviation) of Hp(mg/dl), Alb(g/l), Globulins (g/l), A/G ratio and cortisol (nmol/l) in fattening castrated males and females at 122 and 274 days of age.

Parametro	Sesso	Età	
		122	274
Hp (mg/dl)	Maschi castrati	77.6 (±52.0)	43.7 (±44.5) ^B
	Femmine	78.0 (±53.3)	106.6 (±60.2) ^A
Alb (g/l)	Maschi castrati	25.65 (±2.7)	27.98 (±2.7)
	Femmine	26.6 (±2.6)	28.85 (±2.7)
Glo (g/l)	Maschi castrati	37.1 (±4.4)	37.22 (±4.2)
	Femmine	34.6 (±4.5)	38.04 (±4.0)
A/G	Maschi castrati	0.71 (±0.1)	0.77 (±0.1)
	Femmine	0.78 (±0.1)	0.76 (±0.1)
Cortisolo (nmol/l)	Maschi castrati	55.02 (±25.1)	64.04 (±33.2)
	Femmine	50.73 (±24.2)	64.89 (±42.1)

Lettere diverse in apice indicano differenze per $P < 0.001$

DISCUSSIONE

Gli elevati livelli di emolisi 122 giorni, seppur confrontabili con quelli ottenuti da Rota Nodari *et al.*, 2009, (3 campioni scartati su 41, ovvero il 7%), sono stati successivamente molto contenuti attraverso una maggiore efficienza nel contenimento degli animali, campionamento e processazione entro le 2 ore dal prelievo. Queste attenzioni sono comunque a conferma del fatto che la fase di prelievo rappresenta nella specie suina un notevole punto critico per l'idoneità del campione ematico (Rota Nodari *et al.*, 2009), a causa della fragilità eritrocitaria più elevata rispetto alle altre specie domestiche (Oyewale, 1992). Un approfondimento relativo ai fattori che contribuiscono all'emolisi (soggetto, sesso, tipo di stabulazione ecc.) può essere importante anche in relazione alle possibili correlazioni tra stress e aumento della fragilità eritrocitaria, come dimostrato da Adenkola *et al.*, 2010.

Considerando i valori di Hp, questi rimangono nel corso della prova entro i limiti riportati in letteratura da diversi autori. Petersen *et al.* (2001) hanno trovato valori medi di 76 ± 52 mg/dl, Clapperton *et al.* (2005) a 168 giorni hanno indicato 101 ± 42 mg/dl per i maschi castrati e 110 ± 31 mg/dl per le femmine, Piñeiro *et al.* (2009) a 140 giorni di età hanno riportato valori medi di 89 ± 86 mg/dl, infine Heinonen *et al.* (2010) in suini a fine ingrasso hanno trovato valori variabili di 90-150 mg/dl. Un certo grado di variabilità nei risultati ottenuti dai diversi lavori potrebbe derivare dall'utilizzo di differenti metodiche di laboratorio, che consente una comparazione solo approssimativa dei dati (Eckersall *et al.*, 1999). In riferimento ai dati

riportati bisogna inoltre sottolineare che sono quasi sempre relativi a pochi soggetti, talora senza distinzione in base al genere e provenienti da particolari situazioni sperimentali. Il presente studio, rispetto a quelli citati, è stato impostato su un numero rilevante di soggetti ed in un ben definito contesto produttivo, ma ha comunque confermato la grande variabilità del parametro in oggetto.

Nonostante sia chiara l'influenza delle alterazioni patologiche nella concentrazione di aptoglobina nei suini (Petersen *et al.*, 2004; Salamano *et al.*, 2008; Heinonen, 2010), pochi lavori hanno indagato gli effetti legati alle diverse condizioni fisiologiche. Richter *et al.* (1974), hanno rilevato un aumento della concentrazione di aptoglobina nei primi 50 giorni di vita dei suini e valori significativamente più bassi nei verri rispetto alle scrofe, mentre non sono state evidenziate differenze significative tra maschi castrati e femmine all'ingrasso. Lipperheide *et al.* (1998) e Petersen *et al.* (2002) confermano i risultati di Richter *et al.* (1974) per quanto riguarda la fase di ingrasso, ma sottolineano che l'aumento dei livelli nel tempo sembrerebbe essere legato ad un incremento dei livelli di stress derivanti dalle condizioni di stabulazione piuttosto che ad un effetto età fisiologico. Clapperton *et al.* (2005) non evidenziano alcun effetto età, ma valori significativamente più alti nelle femmine rispetto ai maschi castrati a 126 giorni di vita che non sono più riscontrabili a 168 giorni. Piñeiro *et al.* (2009) evidenziano un aumento del livello in 10 suini (5 maschi e 5 femmine) campionati in modo casuale a 21, 56, 112 e 140 giorni di vita e confermano valori più bassi in 20 verri rispetto a 45 scrofe (94 vs. 147 mg/dl).

I valori significativamente più alti nelle femmine non trovano esatta corrispondenza con i dati di letteratura per quanto riguarda la fase di ingrasso, anche se non è irrilevante la durata del ciclo di allevamento, in quanto i lavori che hanno investigato sulle variazioni di Hp si riferiscono a suini leggeri. Se consideriamo invece i lavori prodotti su scrofe e verri, le femmine presentano valori più elevati di Hp. Le differenze riscontrate nel presente lavoro potrebbero essere collegate ai cambiamenti ormonali fisiologici indotti dal raggiungimento della maturità sessuale, come già ipotizzato da Clapperton *et al.* (2005), piuttosto che a specifiche condizioni di stress, dato che gli altri indicatori fisiologici di stress misurati a 274 giorni (rapporto A/G e cortisolo) rientrano nei *range* di normalità e non evidenziano differenze.

CONCLUSIONI

Non si sono evidenziati chiari effetti legati all'età e al sesso per quanto riguarda i valori sierici di albumine, globuline, rapporto A/G e cortisolo.

Nonostante la correlazione tra Hp ed età degli animali non sia ancora pienamente chiarita, è rilevante il fatto che vi sia nel suino pesante un marcato effetto legato al sesso, che a 274 giorni di vita avvicina la fisiologia di questa categoria produttiva a quella di scrofe e verri, pur essendo i maschi in ingrasso soggetti a castrazione. Tale aspetto dovrà essere tenuto in considerazione in corso di monitoraggi di questo parametro non bilanciati in tal senso.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro fa parte di un progetto di ricerca finanziato dalla Regione Veneto U.P. Sanità Animale e Igiene Alimentare, in collaborazione con Ulss 8 di Asolo.

L'attività di campo è stata possibile grazie alla disponibilità della Ditta Veronesi.

BIBLIOGRAFIA

- Adenkola A.Y., Ayo J.O., Sackey A.K.B., Adelaiye A.B. (2010) "Erythrocyte osmotic fragility of pigs administered ascorbic acid and transported by road for short-term duration during the harmattan season". *African J. Biotech.* 9, 226-233.
- Bottoms GD, Roesel O.F., Rausch F.D., Akins E.L. (1972) "Circadian variation in plasma

cortisol and corticosterone in pigs and mares”. *Am. J. Vet. Res.* 33, 785–790.

Clapperton M., Bishop S.C., Cameron N.D., Glass E.J. (2005) “Association of acute phase protein levels with growth performance and with selection for growth performance in Large White pigs”. *Animal Science* 81, 213-220.

Eckersall P.D., Duthie S., Toussainte M.J.M., Gruys E., Heegaard P., Alawa M., Lipperheide C., Madec F. (1999) “Standardisation of diagnostic assays for animal acute phase proteins”. *Adv. Vet. Sd. Comp. Med* 41, 643-655.

Evans F.D., Christopherson R.J. Aherne F.X. (1988) “Development of the circadian rhythm of cortisol in the gilt from weaning until puberty”. *Can. J. Anim. Sci.* 68, 1105–1111.

Heinonen M., Orro T., Kokkonen T., Munsterjelm C., Peltoniemi O. (2010) “Tail biting induces a strong acute phase response and tail-end inflammation in finishing pigs”. *Vet. J.* 184, 303-307.

Hicks T.A., McGlone J.J., Whisnant C.S., Kattesh H.G., Norman R.L. (1998) “Behavioral, Endocrine, Immune, and Performance Measures for Pigs Exposed to Acute Stress”. *J. Anim. Sci.* 76, 474–483.

Kaneko J.J. (2008). “Clinical biochemistry of domestic animals”. 6th ed. Academic Press, San Diego, California.

Lipperheide C., Diepers N., Lampreave F., Alava M., Petersen B. (1998) “Nephelometric determination of haptoglobin plasma concentrations in fattening pigs”. *J. Vet. Med. A* 45, 545-550.

Murata H., Shimada N., Yoshioka M. (2004) “Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview”. *Vet. J* 168, 28–40.

Oyewale J.O. (1992) “Changes in osmotic resistance of erythrocytes of cattle, pigs, rats and rabbits during variations in temperature and pH”. *J. Vet. Med.* 39, 98- 104.

Petersen H.H., Nielsen J.P., Jensen A.L., Heegaard P.M.H. (2001) “Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of porcine haptoglobin”. *J. Vet. Med. A* 48, 513–523.

Petersen H.H., Ersbøll A.K., Jensen C.S, Nielsen J.P. (2002) “Serum-haptoglobin concentration in Danish slaughter pigs of different health status”. *Prev. Vet. Med.* 54, 325–335.

Petersen, H. H., J. P. Nielsen, and P. M. H. Heegard 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Rev. Res.* 35, 163-187.

Piñeiro C., Piñeiro M., Morales J., Andrés M., Lorenzo E., del Pozo L., Alava M.A., Lampreave F. (2009) “Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms”. *Vet. J.* 179, 78-84.

Piñeiro M., Lampreave F., Alava M.A. (2009). “Development and validation of an ELISA for the quantification of pig Major Acute phase Protein (Pig-MAP)”. *Vet. Imm. Immunopathol.* 127, 228-234.

Richter H. (1974) “Haptoglobin bei haussäugetieren. III. Mitteilung: der haptoglobingehalt im blutplasma und serum von widerkäuern und s Schweinen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen”. *Arch. Exp. Der. Med.* 28, 505–519.

Ruis M.A.W, te Brake J.H.A., Engel B, Ekkel E.D., Buist W.G., Blokhuis H.J., Koolhaas J.M. (1997) “The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effect of age, gender and stress. *Physiology and Behaviour* 62, 623-630.

Rota Nodari S., Archetti I., Guerra P., Candotti P. (2009) “Intervalli di riferimento di alcuni parametri biochimici in scrofe.” In: “Atti della società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini”. XXXV Meeting annuale, Modena 12-13 marzo 2009, 199-206.

Salamano G., Mellia E., Candiani D., Ingravalle F., Bruno R., Ru G., Doglione L. (2008) “Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine”. *Vet. J.* 177, 110-115.