

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI ESTRATTI VEGETALI SULLA MICROFLORA INTESTINALE E SULLE PRESTAZIONI ZOOTECNICHE IN SUINI IN SVEZZAMENTO E PREVISIONE DELLA RISPOSTA CON METODI *IN VITRO*

Federico Correa

INTRODUZIONE

Il post-svezzamento risulta essere una delle fasi più critiche nel ciclo produttivo del suino, fattori stressanti quali l'allontanamento dalla madre, il trasporto, la formazione di nuovi gruppi, la vaccinazione, il cambiamento della dieta, ecc. portano a una diminuzione dell'ingestione di alimento da parte del suinetto, nelle prime settimane post-svezzamento. La ridotta ingestione in questa fase può avere degli effetti negativi sul corretto sviluppo morfologico e funzionale dell'intestino, questi cambiamenti strutturali portano sia a una diminuzione dell'assorbimento dei nutrienti, sia a un disgregamento dell'integrità della mucosa intestinale, che può aprire le porte ai batteri patogeni che penetrando nella lamina propria causano infiammazione e diarrea (Jayaraman and Nyachoti, 2017). Oltre a ciò si osserva anche un'alterazione della normale composizione del microbiota che dipende principalmente dall'alimentazione del suinetto, infatti, nei primi giorni di vita è perlopiù influenzata del latte materno che tende a favorire la crescita dei batteri lattici (LAB). Successivamente allo svezzamento quando avviene la transizione dall'alimento liquido a quello solido, si ha una diminuzione dei Lactobacilli e una conseguente riduzione della diversità del microbiota, questi cambiamenti predispongono alla disbiosi del microbiota intestinale (Gresse et al., 2017). In questo periodo di crescita del suinetto anche lo *Streptococcus suis*, responsabile della meningite batterica, rappresenta insieme a *Escherichia coli* F4⁺ o K88, uno dei patogeni che ha un maggior impatto negativo sulla salute dell'animale. Per controllare la diffusione di questi patogeni si è da sempre fatto largo uso di antibiotici a scopo profilattico e terapeutico, oggi con la diffusione di ceppi batterici resistenti agli antibiotici, si cercano valide alternative agli stessi. Il problema della resistenza agli antimicrobici (AMR), non è legato solo a una diminuzione dell'efficacia nel controllo dei patogeni nel suino, ma anche alla possibile trasmissione orizzontale di geni di resistenza nei confronti di antibiotici considerati di importanza critica per l'uomo. Un esempio è la colistina, considerato dall'OMS un antibiotico di importanza critica per la salute umana (World Health Organization, 2017), il quale è stato largamente utilizzato per controllare le colibacillosi nei suini (Rhouma et al., 2017), desta preoccupazione a causa della comparsa di vari geni plasmidici AMR (Al-Tawfiq et al., 2017), infatti in Italia è stata revocata l'Autorizzazione nazionale all'Immissione in Commercio (AIC) per i medicinali veterinari contenenti colistina in associazione con altri agenti microbici per somministrazione orale a partire dal 25/08/2016 (Decreto n. 117 del 25/07/2016).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti di tre diverse miscele di additivi (Mix 1, Mix 2, Mix 3), impiegate come possibile alternativa agli antibiotici. La composizione di queste miscele è basata sull'utilizzo di antiossidanti e polifenoli di origine vegetale, acidi grassi a media catena, batteriocine e prebiotici. In particolare, la prima miscela (Mix 1) è stata concepita per migliorare lo stato di salute generale dell'animale e contiene: Antiossidante naturale (AO4), estratto di polifenoli vegetali (LS21), estratto di lievito (LS32). La seconda (Mix 2) invece, pensata per contrastare lo *Streptococcus Suis* è composta da: Estratto di polifenoli vegetali (LS45), acidi grassi a catena media (MLKV), proteina funzionale con attività antibatterica (EN1). L'ultima miscela (Mix 3) ideata per contrastare l'*E.coli* K88 contiene: Batteriocina (LA1), antiossidante naturale (A05), antiossidante naturale (AO4), estratto di polifenoli vegetali (LS21). Gli effetti

sono stati valutati sulla composizione microbiologica dello stomaco, del duodeno e dell'ileo, sull'altezza dei villi e la profondità delle cripte e le performance zootecniche (incremento ponderale giornaliero, assunzione di alimento giornaliera, indice di conversione alimentare), nei suinetti nelle prime 4 settimane dopo lo svezzamento. Parallelamente a ciò si è valutata l'efficacia *in vitro* degli stessi additivi, valutandone il possibile effetto prebiotico, il potenziale antibatterico e infine la capacità di agglutinazione nei confronti di *E.coli* K88. Sia la valutazione *in vitro* delle miscele che la sperimentazione *in vivo* sono state svolte presso l'azienda Nuscience N.V. (Gent, Belgio), durante il mio periodo di tirocinio all'estero nell'ambito del programma Erasmus +.

DATI E METODI

La prova è stata effettuata presso un allevamento situato nelle Fiandre (Belgio), per un periodo di 4 settimane, dall'8 settembre 2017 al 6 ottobre 2017. I suinetti utilizzati nella prova erano derivanti dall'incrocio tra un ibrido commerciale Hypor e la razza Piétrain, maschi castrati e svezzati a 21 giorni. I suinetti sono stati pesati allo svezzamento, a 2 e a 4 settimane dopo lo svezzamento. L'assunzione di alimento è stata registrata per box, composto da quattro suinetti per tutta la durata della prova. I suinetti sono stati accasati all'interno di una struttura che è composta da 8 locali diversi, ogni locale contiene 4 box differenti come illustrato nella Figura 1. Ogni box è fornito di un abbeveratoio e una mangiatoia (Figura 2), sia l'alimento che l'acqua vengono somministrati *ad libitum*. La temperatura all'inizio è stata di $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ fino a 10 giorni dopo lo svezzamento, successivamente la temperatura è stata abbassata a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

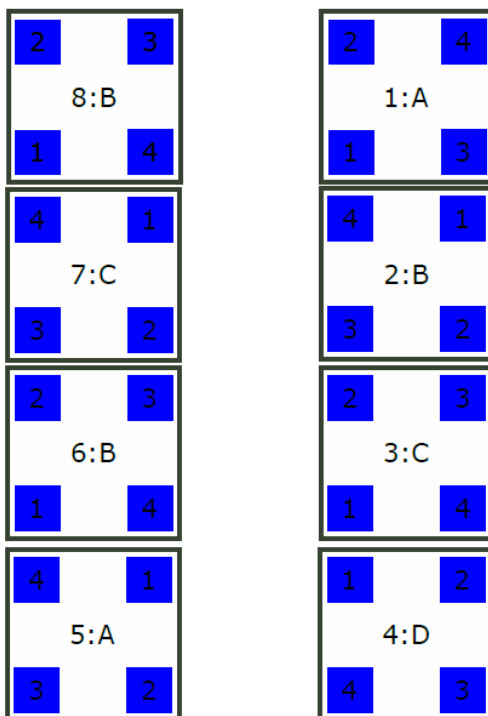


Figura 2. Vista interna di un Box multiplo

Figura 1. Rappresentazione schematica dei vari locali.

Ciascuna delle seguenti diete:

- A: Dieta base (Composizione chimica ed ingredienti rispettivamente nelle tab.2 e 3)
- B: Dieta base + Mix 1
- C: Dieta base + Mix 2

- D: Dieta base + Mix 3

È stata attribuita casualmente e somministrata per tutta la prova a due degli otto locali, I Mix erano formulati per diverse finalità (Mix 1, salute generale; Mix 2, protezione contro *Streptococcus suis*, Mix 3, protezione contro *E. coli* enteropatogeni) ed erano formati da diversi componenti, secondo quanto dettagliato nella tab.1:

- Mix 1 =Antiossidante naturale (AO4), estratto di polifenoli vegetali (LS21), estratto di lievito(LS32)
- Mix 2=Estratto di polifenoli vegetali (LS45), acido grasso a catena media (MLKV), proteina funzionale con attività antibatterica (EN1),
- Mix 3= Batteriocina (LA1), antiossidante naturale (A05), antiossidante naturale (AO4), estratto di polifenoli vegetali (LS21).

Mix:	Componenti dei Mix.	Dossaggio (g/kg)
Mix 1. (General OMNIPOTENT)	A04	0.25
	LS21	0.043
	LS32	0.0625
Mix 2. Focus on Streptococcus	LS45	0.09
	MLKV	0.333
	EN1	0.333
Mix 3. Focus on E. coli	LA1	0.025
	A05	0.25
	A04	0.25
	LS21	0.043

Tabella 1. Composizione e concentrazione degli additivi usati nella prova *in vivo* espresso in g per kg di dieta base.

Analisi	Metodo di analisi	Risultato	Unità di misura
Umidità	NIR	108,16	g/Kg
Sostanza secca	NIR	891,94	g/Kg
Ceneri	NIR	47,89	g/Kg
Fibra Grezza	NIR	36,70	g/Kg
Proteina Grezza	NIR	174,95	g/Kg
Grassi	NIR	45,61	g/Kg
Zuccheri	NIR	48,26	g/Kg
Amido	NIR	418,35	g/Kg
Lattosio	NIR	27,52	g/Kg
Ca	ICP-AES	4,34	g/Kg
P	ICP-AES	5,00	g/Kg
Na	ICP-AES	2,37	g/Kg
Zn	ICP-AES	114,46	mg/Kg
Mn	ICP-AES	89,57	mg/Kg
Fe	ICP-AES	268,62	mg/Kg
Cu	ICP-AES	133,00	mg/Kg
Energia Netta		2.378,00	Kcal
Energia Metabolizzabile		13,45	MJ/Kg

Tabella 2. Composizione chimica della dieta base.

Ingredienti	%
Mais	15
Cereali (grano, orzo)	51.76
Fonte proteica (soia, patata)	21.04
Olio di Soia	1.5
Acidi Organici (fumarico, lattico)	0.7
Premix (contenente lattosio, ammino acidi, minerali, elementi in tracce: vitamine,)	10

Tabella 3. Composizione della dieta base.

Per ogni trattamento erano presenti 8 repliche (box). All'inizio della prova i suinetti, con peso all'incirca di 7 Kg, sono stati alloggiati per box in base al peso. Questa sistemazione permette di avere un peso medio e una deviazione standard intorno al peso medio uguale per ogni trattamento. Prima e durante la prova non sono stati somministrati antibiotici con la dieta agli animali, in caso di necessità venivano effettuati dei trattamenti antibiotici individuali tramite iniezione, tutti i trattamenti sono stati annotati.

I parametri rilevati durante la prova sono stati:

- Peso iniziale, peso dopo 14 giorni e peso finale,
- Assunzione di alimento e indice di conversione alimentare per box, durante la prima settimana, durante le prime due settimane e per tutto il periodo di prova.
- Analisi microbiologica: Conta batterica di *Lactobacilli* / *E. coli* / *Enterobacteriaceae* sul contenuto di stomaco, ileo e duodeno.
- Analisi istologica: Altezza dei villi e profondità delle cripte su campioni di duodeno e ileo.
- Diarrea score: il punteggio va da 1 a 3, dove 1: feci normali, 2: feci soffici, 3: feci acquose.

Per la raccolta dei dati microbiologici e istologici i suinetti sono stati sacrificati, per sedazione/soppressione con overdose di barbiturici (Nembutal).

Per quanto concerne i campioni per le analisi microbiologiche, si raccoglieva il contenuto di stomaco, ileo e colon. Successivamente si effettuavano le diluizioni dei vari campioni a concentrazione decrescente e si seminavano su diversi terreni, rispettivamente: rapid *E. coli* agar (*E. Coli* K88), MRS agar (LAB), MacConkey agar (*Enterobacteriaceae*).

I campioni di tessuto prelevati dall'ileo e dal duodeno venivano assicurati con una certa tensione al legno di balsa, fissati per una notte in formalina tamponata al 10% e inclusi in paraffina. I campioni fissati con formalina e paraffina sono poi stati deparaffinati in xilene e colorati con ematossilina-eosina per la valutazione morfometrica. Per ciascun campione sono state misurate l'altezza di 10 villi e la profondità di 10 cripte. Le sezioni sono state esaminate a basso ingrandimento con il microscopio Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Germania), interfacciato a una fotocamera digitale dotata di software Cytometric (Byk Gulden, Italia).

Test per l'effetto Prebiotico

I prebiotici sono generalmente definiti come polisaccaridi e oligosaccaridi non digeribili (NDO), che promuovono la crescita di batteri lattici benefici nel colon ed esercitano un'azione antagonista su *Salmonella sp.* o *Escherichia coli*, limitando la loro proliferazione (Patel and Goyal, 2012). Per valutare l'effetto prebiotico di un prodotto, nel laboratorio delle Nuscience N.V. viene monitorata la crescita di un insieme di batteri lattici. Per eseguire questo test, viene utilizzato terreno di crescita MRS privato della fonte di glucosio, che viene rimpiazzato dai diversi prodotti in analisi. All'inizio del test le provette vengono preparate inserendo 0,32 g di MRS senza glucosio, 0,2 g del campione in esame e 10 ml di acqua demineralizzata, per il controllo positivo vengono aggiunti 0,2 g di glucosio al posto del campione, dopo di che le provette vengono sterilizzate in autoclave e vengono aggiunti 100 µl di una soluzione contenente LAB in ogni provetta, dopodiché viene

eseguita una conta batterica su agar MRS e incubiamo le piastre a 37 ° C per 48 ore. Dopo 48 ore, viene eseguita un'altra conta batterica per monitorare la crescita batterica. Alla fine, viene assegnato ad ogni campione un punteggio da 0 a 3, dove: 0 = morte dei batteri, 1 = meno crescita del controllo negativo, 2 = tra controllo negativo e positivo, 3 = sopra il controllo positivo. Test per l'effetto Antibatterico

Lo scopo di questo test è quello di misurare l'effetto antibatterico del campione in esame, ovvero la capacità di un composto chimico di uccidere un microrganismo. Questo test è stato eseguito nel laboratorio della Nuscience N.V. (Gent, Belgio), seguendo il protocollo correntemente utilizzato su due batteri diversi, *Escherichia Coli* K88 e *Streptococcus suis*:

- **Preparazione dei campioni all'interno della beuta:** Per entrambi i test vengono utilizzati 20 g della dieta base a cui vengono aggiunte diverse concentrazioni di prodotto, in base all'efficacia di quest'ultimo, mentre per i diversi mix vengono utilizzate le stesse concentrazioni usate nella prova *in vivo*. In seguito, vengono aggiunti 80 ml di acqua demineralizzata. Il controllo positivo è rappresentato dal prodotto MLKV essendo il più efficace dei prodotti.
- **Test *Escherichia coli*:** Per questo test la temperatura viene portata a 37.5°C e il pH tra 3.5 e 4 per simulare l'acidità dello stomaco, quest'ultima parte è importante per capire se l'*Escherichia coli* riesce a sopravvivere nello stomaco in caso di ingestione accidentale da parte dell'animale. Il test inizia quando vengono aggiunti 100 µl di soluzione contenente *E.coli* K88, diluita 1:100, in ogni campione, in seguito vengono subito prelevati 100 µl del campione e seminati su agar TBX, incubati a 36°C per 24 ore e contate le colonie. Un'altra conta batterica viene effettuata 3 ore dopo per monitorare l'effetto di ogni singolo prodotto sulla crescita dell'*E.coli*.
- **Test *Streptococcus suis*:** per questo test viene adattata solo la temperatura a 37.5°C, poi ad ogni campione vengono aggiunti 100 µl di una soluzione contenente *S.suis*, diluita 1:100. Viene eseguito una semina su KFs *Streptococcus* agar al tempo 0 e 3 dopo per monitorare l'effetto di ogni prodotto sulla crescita del batterio. Le piastre vengono incubate a 36°C per 48 ore.

Test di agglutinazione

L'agglutinazione è un processo per la quale i batteri tendono ad aderire tra di loro e formare agglomerati. Questo test che è stato utilizzato seguendo il protocollo messo in uso presso il laboratorio della Nuscience N.V. (Gent, Belgio), ha lo scopo di verificare l'effetto agglutinante di ogni singolo prodotto su *Escherichia coli* K88, l'agglutinazione dei batteri non permette agli stessi di aderire ai microvilli intestinali, essendo quest'ultimo il primo step necessario allo stesso per esplicare la sua attività patogenica (Nagy and Fekete, 2005). Per determinare l'effetto agglutinante dei campioni viene utilizzata una scala di punteggio visiva, questo sistema di valutazione è soggettivo e per diminuire la percentuale di errore ogni risultato deve essere confermato almeno 2 volte. Questa scala presenta: ++ tutti i batteri agglutinati, + presenza di agglutinazione, 0 possibile effetto agglutinante, - nessun effetto (Figura 4.).

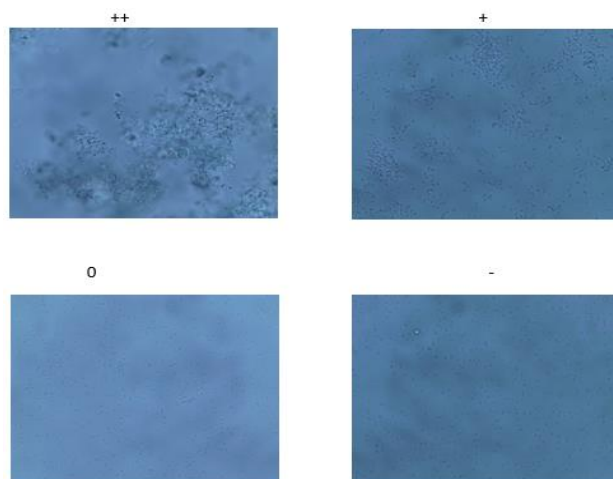


Figura 4. Punteggio Agglutinazione

I dati zootecnici sono stati analizzati mediante analisi della varianza ad una via (effetto della dieta). Per i dati di crescita e per quelli ottenuti al sacrificio si è utilizzato il singolo suino come unità sperimentale, per i dati di consumo e di indice di conversione, il box. L'effetto di ciascuna dieta Mix è stato confrontato con quello del controllo mediante test di Dunnett

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La prova *in vivo* ha avuto una durata di 4 settimane, in cui tra le diverse miscele, il Mix 2 ha presentato le migliori performance produttive, in tutte le fasi oggetto di studio, fatta eccezione per l'indice di conversione che risulta essere migliore nelle prime due settimane mentre nelle fasi successive eguaglia i risultati ottenuti con il Mix 3. Nelle prime due settimane l'incremento ponderale ottenuto con il Mix 2 risulta essere significativamente maggiore rispetto al controllo ($p=0.02$), questi risultati potrebbero essere dovuti all'utilizzo di un acido grasso a media catena (MLKV), che come osservato in alcuni studi (Hanczakowska et al., 2011) abbassando il pH a livello gastrico migliora la digeribilità e di conseguenza aumenta l'utilizzo dell'alimento da parte degli animali. Le analisi microbiologiche del contenuto di ileo, colon e stomaco hanno mostrato una certa variabilità nei risultati, prese singolarmente le conte batteriche dei LAB erano superiori in tutti i tratti per il Mix 2 ma non in modo statisticamente significativo, le *Enterobacteriaceae* avevano differenze tra i diversi tratti ma nel colon dove la presenza batterica è in generale nettamente più consistente, i suinetti supplementati con il Mix 2 avevano un numero di *Enterobacteriaceae* inferiore in modo tendenzialmente significativo ($p=0.06$). Questi due dati insieme potrebbero spiegare le migliori performance produttive del Mix 2. Per quanto riguarda il rapporto tra altezza dei villi e profondità delle cripte, è stata osservata abbastanza variabilità tra i soggetti e nel complesso non si sono viste differenze statisticamente significative, d'altronde i campioni sono stati presi alla fine della prova, quando la crescita si era piuttosto omogeneizzata, e questo si riflette anche nel quadro fornito dalle misure morfometriche della mucosa. Le analisi *in vitro* erano concepite come una fase di screening per selezionare gli additivi più efficaci per poi confermare l'efficacia *in vivo* e nel complesso hanno fornito risultati solo parzialmente concordanti con i risultati osservati *in vivo*.

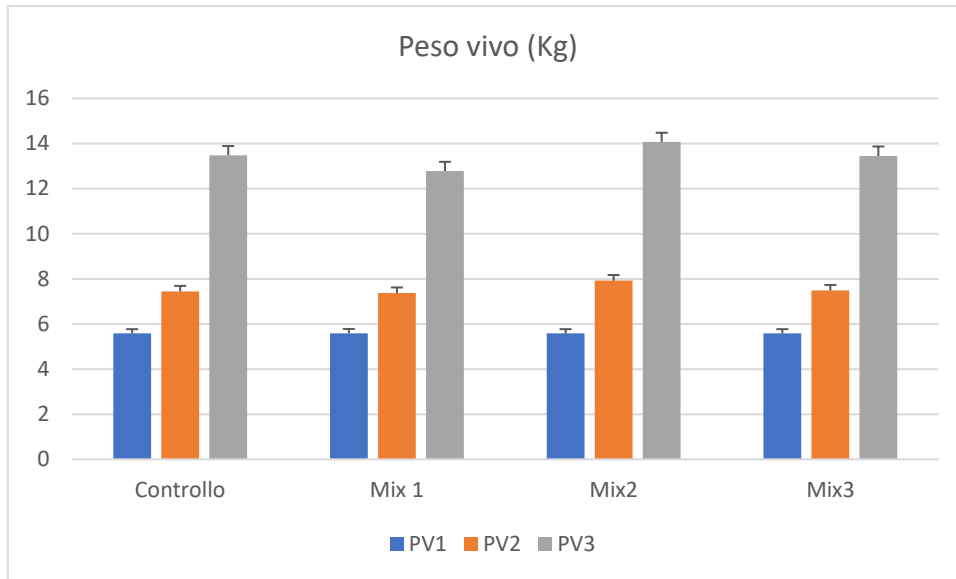


Figura 5: Medie ed errori standard del peso vivo dei vari gruppi, nelle diverse fasi.

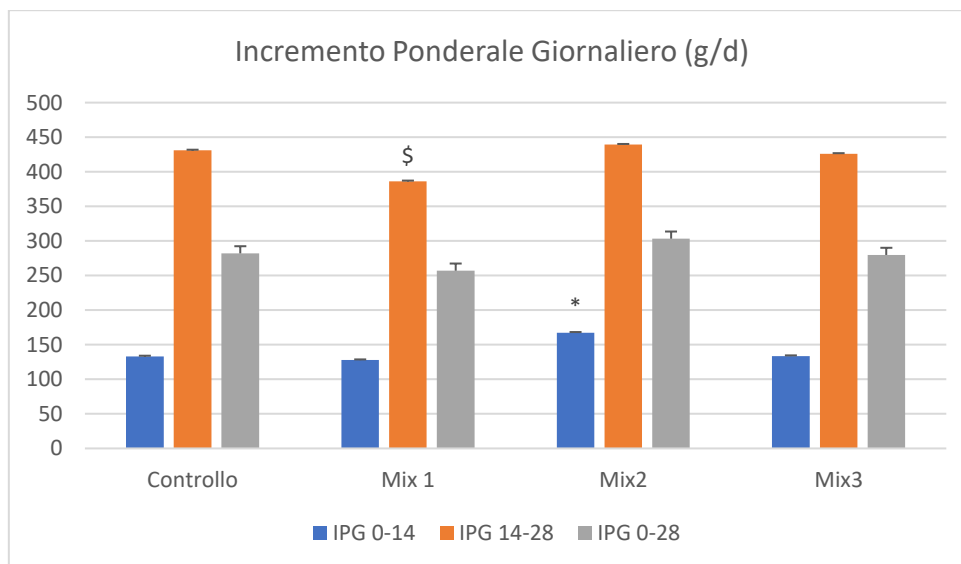


Figura 6: Medie ed errori standard dell'incremento ponderale giornaliero (IPG), dei vari gruppi, nelle diverse fasi. \$:0.010<p>0.05;*: p<0.05

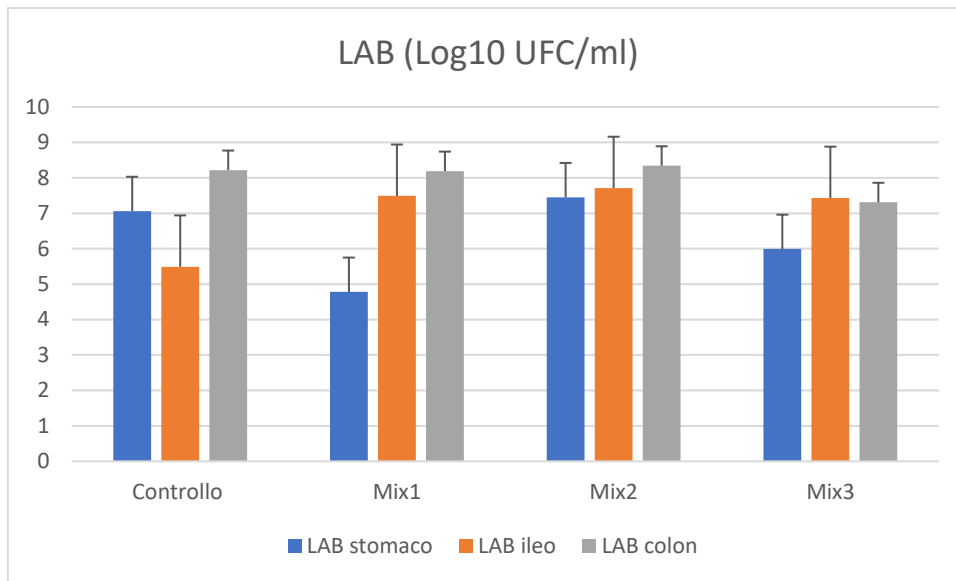


Figura 7. Conta batterica dei batteri lattici (LAB) in colon, stomaco e ileo dei suini sacrificati di ogni gruppo (medie ed errori standard).

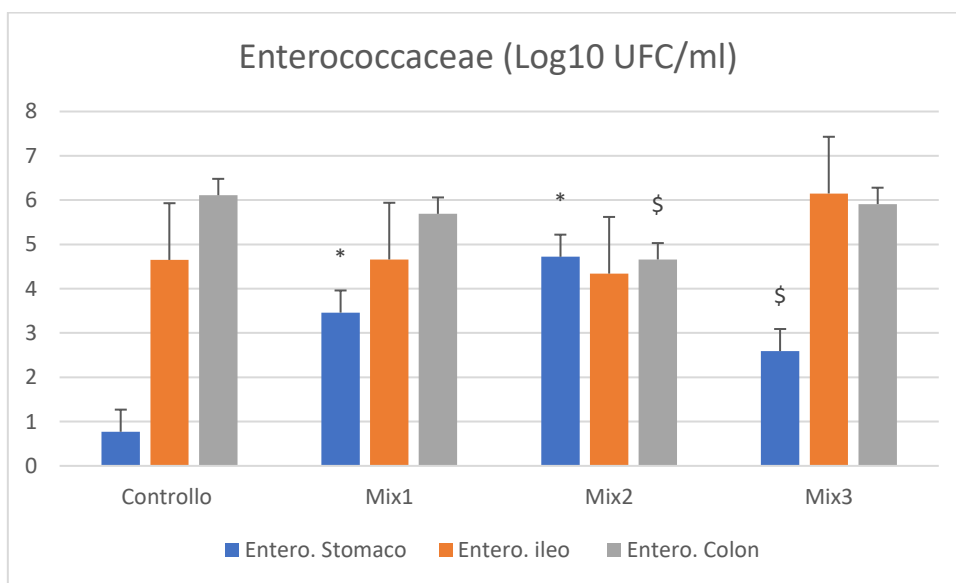


Figura 8. Conta batterica delle *Enterobacteriaceae* in stomaco, ileo e colon dei suini sacrificati dei vari gruppi (Medie ed errori standard). *: $0.010 < p < 0.05$; \$: $p < 0.05$

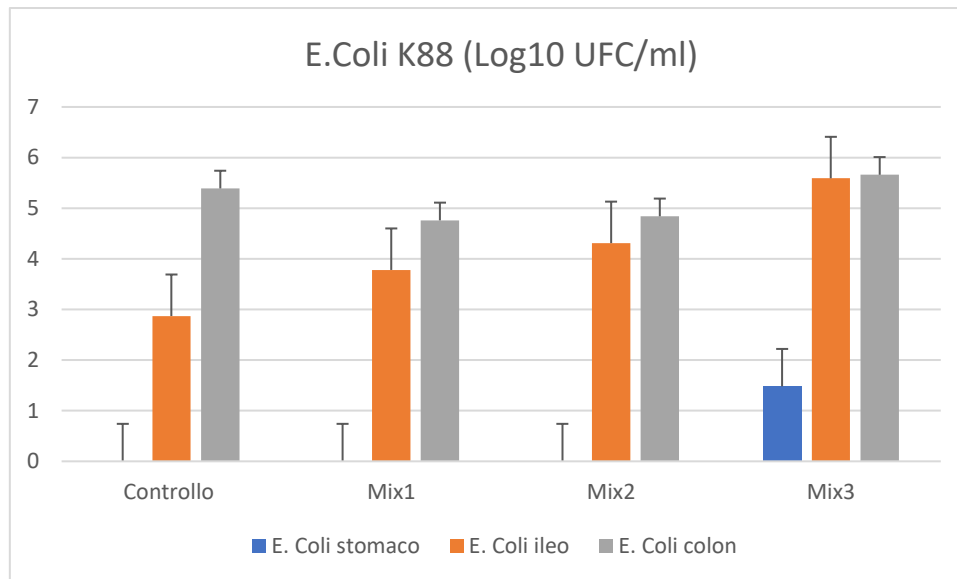


Figura 9: Conta batterica dell'*Escherichia Coli* K88 (Medie ed errori standard) in stomaco, ileo e colon dei suini sacrificati di ogni gruppo.

In conclusione, la messa a punto di un prodotto da fornire in miscela per contrastare lo *Streptococcus suis* (Mix2) e in generale migliorare lo stato di salute dell'animale, combinando un estratto di pianta, un acido grasso a catena media ed una proteina vegetale con effetto antibatterico ha permesso di migliorare la crescita nel post-svezzamento. Viceversa, l'assenza di risposta *in vivo* con altre premiscele che contenevano prodotti apparentemente efficaci *in vitro* dimostra l'importanza della verifica di campo in condizioni sperimentalmente controllate prima di proporre l'impiego di nuovi prodotti.

BIBLIOGRAFIA

1. Al-Tawfiq, J.A., Laxminarayan, R., Mendelson, M., 2017. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? *International Journal of Infectious Diseases* 54, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.415>.
2. Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M.A., Van de Wiele, T., Forano, E., Blanquet-Diot, S., 2017. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol.* 25, 851–873.
3. Hanczakowska, E., Szewczyk, A., Okoń, K., 2011. Effects of dietary caprylic and capric acids on piglet performance and mucosal epithelium structure of the ileum. *J. Anim. Feed Sci.* 20, 556–565.
4. Jayaraman, B., Nyachoti, C.M., 2017. Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Anim. Nutr.* 3, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.002>
5. Macwana, S., Muriana, P.M., 2012. Spontaneous bacteriocin resistance in *Listeria monocytogenes* as a susceptibility screen for identifying different mechanisms of resistance and modes of action by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods* 88, 7–13.
6. Nagy, B., Fekete, P.Z., 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 443–454.
7. Patel, S., Goyal, A., 2012. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech* 2, 115–125.
8. Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Beaudry, F., Letellier, A., 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand* 59. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0299-7>

9. WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance, World Health Organization, 2017. Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use.