

CONVENZIONE ANAS - CREA/ZA

per lo svolgimento di una prova di valutazione dell'effetto di diversi livelli proteici a parità di apporti amminoacidici nella dieta di suinetti dallo svezzamento a 30 kg

RELAZIONE D'ATTIVITÀ E RISULTATI

EFFETTO DEL TENORE PROTEICO NELLA DIETA SULL'INCIDENZA DEI CASI DI DIARREA IN SUINETTI POST SVEZZAMENTO

Per i suinetti il periodo compreso fra lo svezzamento (cioè l'allontanamento dalla madre) e il raggiungimento del peso di ristallo (a circa tre mesi di età e 35-40 kg di peso vivo) è senza dubbio il più delicato dal punto di vista della sanità e del funzionamento dell'apparato digerente.

Fra i numerosi fattori che possono intervenire a destabilizzare il delicato equilibrio dell'intestino del suinetto, legato ad una fase di accelerazione della maturazione sia morfologica che enzimatica, quelli alimentari rivestono senza dubbio un ruolo fondamentale (Gao et al. 2020).

Fra i fattori alimentari la qualità e la quantità di proteine somministrate ai suinetti giocano un ruolo di primo piano. In questa fase infatti il soddisfacimento di fabbisogni nutritivi richiede un livello proteico superiore alla potenzialità di digestione del suinetto. Secondo Kim et al (2012), per le moderne linee a rapido accrescimento è necessario un livello proteico compreso fra il 21,5% e il 24%, livello che, appunto, è superiore alla capacità di digestione del suinetto; tali autori suggeriscono nei primi giorni dopo lo svezzamento un livello proteico non superiore al 18% e con una consistente aggiunta di amminoacidi di sintesi.

La presenza di proteine non digerite consente la proliferazione di una flora batterica produttrice di tossine in grado di alterare la barriera intestinale (alterazione delle proteine delle giunzioni occludenti o *tight junction proteins*). Quest'alterazione ha per conseguenze la colonizzazione dell'epitelio

intestinale da parte di microrganismi patogeni; l'accelerazione della produzione di enterociti che, poiché immaturi, hanno un'attitudine essudativa più che assorbente; una maggior facilità di attraversamento della barriera cellulare da parte di specifiche tossine batteriche (malattia degli edemi).

La produzione di ammoniaca, ammine biogene, fenoli, indoli, acidi grassi ramificati (*branched chain fatty acids*, BCFAs) sarebbe associata a specie batteriche quali *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Clostridium*; in particolare questi ultimi produrrebbero BCFAs, che sono stati suggeriti come indicatori dell'intensità della fermentazione proteica intestinale (Gao et al. 2020). In sintesi, secondo questi autori, un alto livello proteico favorisce la produzione di ammoniaca e BCFAs e quindi la proliferazione di una flora batterica patogena, mentre un basso livello proteico favorisce la produzione di acidi grassi a corta catena (*short chain fatty acids*, SCFAs), in primo luogo acido butirrico, che favoriscono la proliferazione di una flora batterica benefica. Gli stessi autori, mettendo a confronto due livelli proteici ottenuti entrambi esclusivamente con caseina (17% vs 30%), hanno messo in evidenza che con un alto livello proteico si riduce la diversità batterica del microbiota.

Un più alto livello proteico consente comunque un migliore soddisfacimento dei fabbisogni del suinetto. Opapeju et al (2008) hanno confrontato 4 diete somministrate a suinetti del peso iniziale di circa 6,5 kg:

- Mangime di controllo al 21% di protidi grezzi;
- Mangime al 19% di protidi grezzi e carente in isoleucina;
- Mangime al 19% di protidi grezzi integrato con isoleucina di sintesi per arrivare al livello di isoleucina del mangime di controllo;
- Mangime al 17% di protidi grezzi integrato con isoleucina e valina per arrivare alla proporzione indicata dalla proteina ideale.

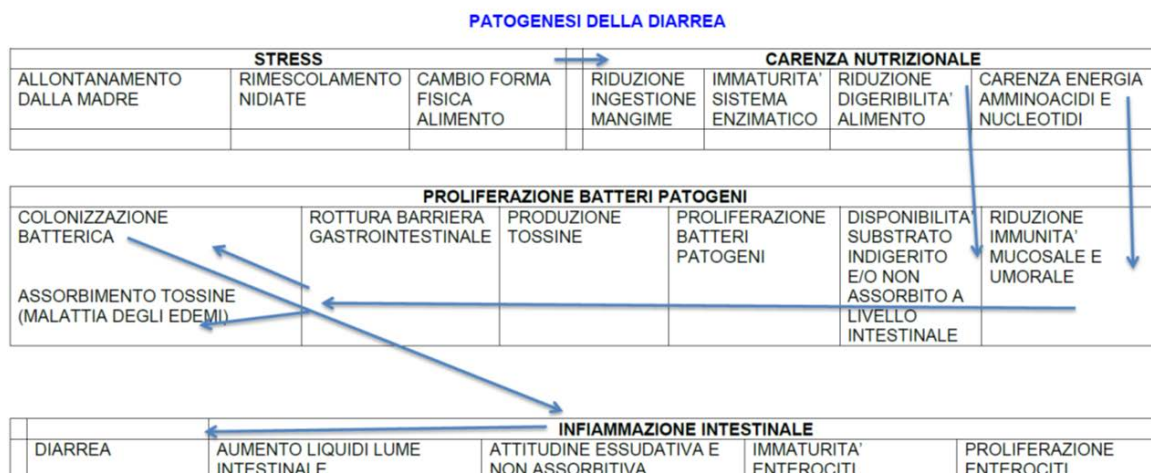
Il gruppo di controllo ha mostrato migliori prestazioni produttive in termini di accrescimento ed indice di conversione, anche se ha mostrato feci più molli, una maggiore quantità di ammoniaca nelle feci e una maggiore profondità delle cripte della mucosa intestinale, indice di un'accelerazione della

produzione di enterociti; in sostanza, migliori prestazioni produttive, ma una maggiore suscettibilità all'instaurarsi di una sindrome a carico dell'apparato gastro-intestinale.

Tale situazione di precario equilibrio può essere tenuta sotto controllo facilmente con una mirata profilassi antibiotica, cosa che non è più consentita, e anche gli spazi per una, sia pur oculata, metafilassi diventano sempre più ristretti. Dunque è necessario individuare strategie di alimentazione che riducano il rischio di comparsa di alterazioni della funzione gastrointestinale del suinetto (Rhouma et al., 2017), e riservare il ricorso agli antibiotici alle situazioni patologiche clinicamente conclamate.

La conoscenza della composizione e delle funzioni del microbiota del suino può servire a migliorarne lo stato di salute e le prestazioni produttive, e a ridurre l'uso di antibiotici. Questi obiettivi possono essere perseguiti indirizzando la dinamica microbica intestinale nella direzione desiderata, per esempio mediante modulazione della dieta (Fouhse et al., 2016).

Con gli stessi obiettivi il microbiota dei suinetti sani e suscettibili a diarrea post svezzamento (*Post weaning diarrhoea*, PWD) è stato oggetto di numerose indagini (Gresse et al. 2017; Guevarra et al., 2018; Guevarra et al., 2019), che hanno evidenziato come lo stato di salute del suinetto e la sua suscettibilità alle malattie, PWD in particolare, possano essere messi in relazione con il cambiamento nella composizione del microbiota durante le prime fasi di crescita. Tutti i fattori che influiscono sulla suscettibilità a PWD hanno anche un effetto sulla composizione del microbiota. L'alimentazione riveste tra questi un ruolo primario. Rist et al. (2013) suggeriva di ridurre le proteine e aumentare i carboidrati fermentabili nella dieta per ridurre le fermentazioni proteiche nocive, e metteva in evidenza come anche la fonte proteica possa condizionare diversamente la composizione del microbiota.



Obiettivo della ricerca è stato di valutare l’effetto del livello proteico nella dieta sull’incidenza dei fenomeni di PWD nei suinetti e la relazione tra dieta, PWD e composizione del microbiota intestinale dei suinetti.

MATERIALI E METODI

La prova è stata avviata il 07/11/19 su linee di incrocio Duroc Italiana X Large White Italiana, (seme fornito da ANAS). Sono stati utilizzati 144 suinetti svezzati dell’età media di $25 \pm 1,5$ giorni, metà maschi castrati e metà femmine intere.

Disegno sperimentale

A confronto erano due livelli proteici nella dieta: alto e basso (**Tab. 1**).

Tabella 1. Percentuale complessiva di proteina nella dieta, in relazione al trattamento. La lisina nella prima fase dello svezzamento era 1.4%, nella seconda fase l’1.2% dell’apporto complessivo di mangime. I 15 kg di peso sono stati raggiunti dopo 26 gg dall’inizio della prova, momento in cui è stata cambiata la dieta. Lo svezzamento è finito a 90 gg di età degli animali

Fase di crescita	Livello proteico ALTO ("Alta proteina")	Livello proteico BASSO ("Bassa proteina")
Da svezzamento a 15 kg	18.5	16.5
Da 15 kg a fine svezzamento	16.5	14.5

Nel periodo da inizio prova e fino alla messa a terra (**Fig. 1**) i suinetti sono stati collocati in 12 gabbie da 12 individui ciascuna (**Fig. 2**), distribuiti il più omogeneamente possibile nell'ambito di ogni gabbia per peso, età e nidiata di provenienza. Poiché non era possibile ospitare 12 gabbie all'interno della stessa sala, i maschi sono stati alloggiati in una sala (6 gabbie in sala 1) e le femmine in un'altra (6 gabbie in sala 3). In questo modo si è dovuto accettare di avere a che fare con un effetto confuso (sala e sesso), mentre il fattore di interesse della prova (livello proteico) è stato omogeneamente rappresentato in entrambe le sale. Ogni gabbia era delle dimensioni di 3,3 m², con pavimentazione in plastica rigida. Il mangime completo è stato somministrato ad libitum in una mangiatoia a tramoggia con 4 posti in modo tale da garantire un sufficiente accesso all'alimentazione a tutti i suinetti; in ogni gabbia era presente un abbeveratoio a succhiotto.

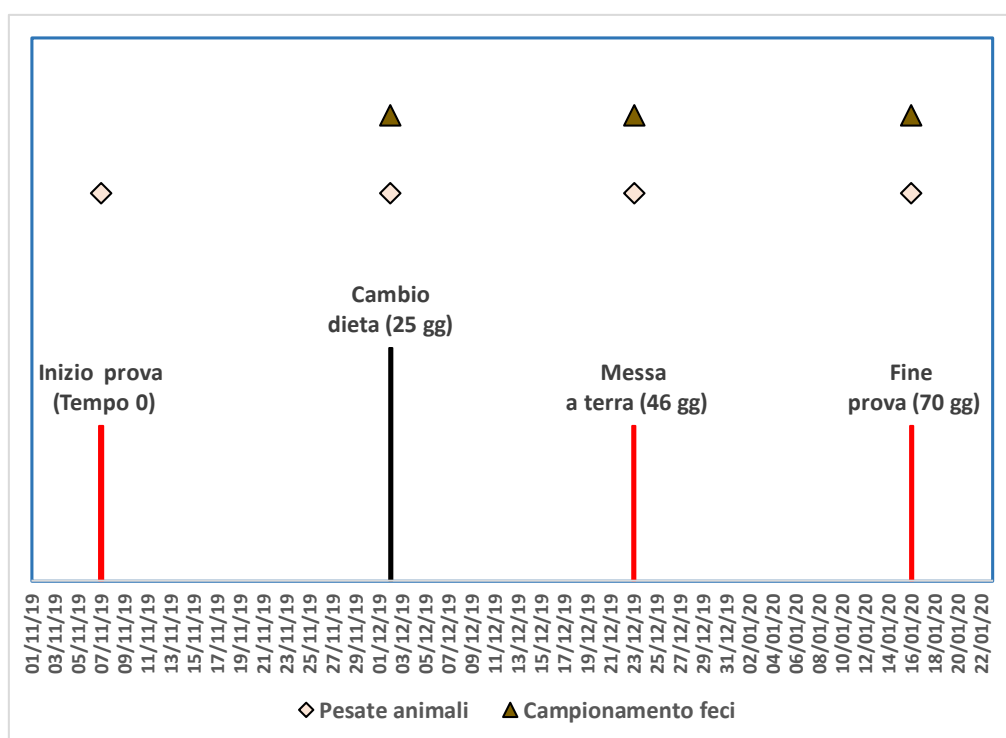


Figura 1: Fasi di crescita dei suinetti e date del cambio di alimentazione, delle pesate degli animali e del campionamento di feci. A inizio prova (tempo 0) i suinetti avevano 25 giorni d'età

Alla messa a terra i suinetti sono stati ospitati in 12 box da 12 suinetti ciascuno (**Fig. 3**). I box (ognuno di 9 m²), erano disposti su due file da 6 (3 box di maschi e 3 di femmine), una per ciascun livello

L'associazione del trattamento alle postazioni ha seguito il criterio di ridurre al minimo le possibilità di contaminazione con feci da livelli proteici diversi.

Figura 2: Distribuzione dei suinetti nelle gabbie (porcilaia nuova) da inizio svezzamento a messa a terra. In rosa le femmine e in azzurro i maschi. Alto livello proteico con ombreggiatura, basso livello proteico senza ombreggiatura

Figura 3: Distribuzione dei suinetti nei box (porcilaia vecchia) dalla messa a terra a fine prova. In rosa le femmine e in azzurro i maschi. Alto livello proteico con ombreggiatura, basso livello proteico senza ombreggiatura

6

I livelli di lisina totale nel mangime di primo e secondo periodo erano rispettivamente 1,4% e 1,2%.

Le percentuali di metionina, metionina + cistina, treonina e triptofano sono state bilanciate secondo la proporzione della proteina ideale con l'aggiunta di amminoacidi di sintesi in forma libera; non è stato bilanciato il sesto amminoacido essenziale limitante, l'isoleucina, che ancora non è disponibile per uso zootecnico.

Sono stati formulati 4 mangimi con le caratteristiche riportate in **Tab. 2**.

Tabella 2. Mangimi utilizzati nel corso della prova.

INGREDIENTI		DA 8 A 15 KG DI PESO VIVO		DA 15 A 30 KG DI PESO VIVO	
		ALTA PROTEINA	BASSA PROTEINA	ALTA PROTEINA	BASSA PROTEINA
Orzo	%	19,98	20,00	15,00	15,00
Mais	%	18,77	23,73	26,63	34,97
Frumento espandato	%	10,00	10,00	6,00	6,00
Soia f. e. 48%	%	8,87	2,73	8,43	3,07
Farinaccio di grano duro	%	0,00	0,00	8,13	4,60
Sottoprodotti da forno	%	8,00	8,00	4,00	4,00
Siero dolce	%	6,00	6,00	0,00	0,00
Concentrato proteico di soia 65%	%	5,00	5,00	2,00	2,00
Integratore oligominerale vitaminico	%	5,00	5,00	2,50	2,50
Crusca di grano tenero	%	4,23	5,00	4,00	4,00
Frumento	%	4,00	4,00	8,00	8,00
tritello di grano tenero	%	0,00	0,00	8,00	8,00
Farina di pesce 68%	%	3,00	3,00	2,00	2,00
Destrosio	%	2,50	2,50	1,00	1,00
Fosfato monobasicco	%	1,57	1,64	0,00	0,21
Cicoria	%	1,20	1,20	1,00	1,00
Olio di cocco	%	0,96	0,83	1,16	1,04
Olio di soia	%	0,00	0,00	0,50	0,50
Acidificanti	%	0,80	0,80	0,80	0,80
DL- Metionina	%	0,05	0,12	0,18	0,25
L-Valina	%	0,05	0,17	0,00	0,08
L-Lisina	%	0,01	0,22	0,47	0,68
L-Triptofano	%	0,01	0,04	0,05	0,09
L-treonina	%	0,00	0,02	0,14	0,23
Valori calcolati					
Protidi grezzi	%	18,50	16,55	16,50	14,60
Lipidi grezzi	%	5,00	5,00	4,50	4,50
Fibra grezza	%	2,96	2,85	3,90	3,50
Ceneri	%	6,07	5,87	5,50	5,31
Energia Digeribile	kcal/kg	3472,00	3450,00	3324,00	3320,00
Energia Metabolizzabile	kcal/kg	3289,00	3277,00	3176,00	3180,00

Energia Netta	kcal/kg	2480,00	2510,00	2401,00	2447,00
Lisina	%	1,40	1,40	1,20	1,20
Metionina	%	0,54	0,58	0,45	0,49
Metionina + Cistina	%	0,84	0,84	0,72	0,72
Treonina	%	0,92	0,84	0,72	0,72
Triptofano	%	0,28	0,28	0,24	0,24
Valina	%	0,98	0,98	0,86	0,84
Isoleucina	%	0,78	0,65	0,68	0,56
Calcio	%	0,65	0,65	0,59	0,62
Fosforo	%	0,78	0,77	0,50	0,50

Parametri di crescita e analisi statistica

La stima dell'effetto del livello proteico nella dieta sulle prestazioni produttive è stata realizzata mediante analisi della varianza a un fattore. Valori di F con $P > 0.05$ erano considerati non significativi (n.s.). Le prestazioni produttive sono state valutate in base ai seguenti parametri (variabili dipendenti): accrescimento medio giornaliero ($AMG = (\text{peso a fine periodo} - \text{peso a inizio periodo}) / \text{gg}$), ingestione media giornaliera ($IMG = \text{consumo di alimento nel periodo} / \text{gg}$) e indice di conversione alimenti ($ICA = IMG / AMG$) nei periodi da inizio prova al cambio di dieta (0-25 gg), dal cambio dieta alla messa a terra (26-45 gg), e dalla messa a terra a fine prova (46-70 gg). Gli animali sono stati pesati individualmente alle date di cui in **Fig. 1**. Poiché i consumi alimentari erano conosciuti a livello di box, i valori delle variabili dipendenti IMG e ICA non erano noti a livello individuale. Per omogeneità, sono stati elaborati a livello di box, con sei repliche complessive, anche i dati di Accrescimento Medio Giornaliero, che pur erano noti a livello individuale.

Punteggio diarrea e interventi correttivi

Lo stato di salute dei suinetti è stato monitorato quotidianamente. A ogni gabbia/box è stato attribuito un punteggio, in base alla numerosità dei casi e all'entità (lieve, media, grave) dei fenomeni diarroici nei suinetti, valutata in base alla consistenza delle feci (**Tab. 3**).

Tabella 3. Punteggi diarrea attribuiti a ogni gabbia/box

Frazione di nidiata ⁽¹⁾ affetta da diarrea	Entità del fenomeno		
	LIEVE	MEDIA	GRAVE
0	0	0	0
1/3	1	4	7
2/3	2	5	8
3/3	3	6	9

⁽¹⁾ 12 suinetti per gabbia o box

I suinetti affetti da diarrea sono stati curati individualmente (**Tab. S1**], in appendice) per via parenterale con antibiotici prima del cambio di dieta, con enrofloxacin o marbofloxacin. Non è stato somministrato nessun antibiotico tra cambio dieta e messa a terra, perché non si sono avuti casi di diarrea. Dopo la messa a terra tutti gli animali sono stati trattati per via orale con colistina solfato, a partire da 5 giorni dopo dalla messa a terra e per 8 giorni (dal 28 dicembre al 4 gennaio). Nessun trattamento è stato applicato negli ultimi 12 giorni, prima del terzo e ultimo campionamento di feci.

Analisi del microbiota delle feci

I campioni di feci sono stati prelevati il 02/12/19, il 23/12/19 e il 16/01/20 (**Fig. 1**). Per ogni gabbia/box le feci individuali sono state riunite in un campione composito. I campioni sono stati immediatamente congelati e conservati a -20 °C fino al momento dell'analisi. Sul DNA dei campioni di feci è stata realizzata analisi del microbiota mediante sequenziamento delle regioni V3-V4 del gene 16S rRNA. È stata stimata l'alfa diversità delle popolazioni, l'abbondanza relativa (in %) delle componenti microbiche (Operative Taxonomic Units: OTUs) fino a livello di famiglia e di genere, e il loro raggruppamento in base alle fonti di variazione. Per la rappresentazione grafica a istogrammi dell'abbondanza relativa (% OTUs) sono state utilizzate le 12 famiglie percentualmente più abbondanti.

L'alfa-diversità (=biodiversità) è un indice di ricchezza (numerosità) e diversità (abbondanza relativa) di OTUs in una popolazione. La ricchezza di specie è indicata dal numero totale di OTUs nella comunità microbica ("Observed"): più elevato è il numero, più specie sono presenti. L'indice CHAO1

stima la ricchezza delle specie dando peso particolare a quelle meno abbondanti. Il valore di CHAO1 è almeno uguale a “Observed” e aumenta all’aumentare della numerosità di specie più rare. L’indice di Shannon (H) si calcola come segue:

$$\text{Shannon Index (H)} = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

dove: s= è il numero totale di OTUs e p è la proporzione della comunità rappresentata dall’OTU i.

Aumenta all’aumentare della ricchezza di specie, dell’uniformità e dell’incertezza della stima.

I campioni sono stati raggruppati per somiglianza compositiva mediante Principal Coordinate Analysis (PCoA: Analisi delle coordinate principali). La PCoA serve a ridurre il numero delle variabili a disposizione mettendo in evidenza le dissimilarità tra i diversi campioni in base alle sole variabili principali.

Su famiglie selezionate è stata applicata un’ANOVA a due vie (fonti di variazione: tempo, trattamento, tempo x trattamento) per la stima dell’effetto della dieta e della fase di crescita sul numero di *reads* (= abbondanza relativa della famiglia nel campione analizzato)

RISULTATI E DISCUSSIONE

Prestazioni produttive

Gli animali della tesi Alta proteina hanno mostrato un accrescimento medio giornaliero significativamente maggiore ($p < 0,01$) di quelli della tesi Bassa proteina (**Tab. 4**) nei primi 25 giorni di prova fino al cambio di dieta, mentre dal cambio dieta alla messa a terra gli accrescimenti sono stati i medesimi per le due tesi; anche nell’arco dell’intera fase in gabbia la differenza è rimasta significativa ($P < 0,05$). L’ingestione volontaria di alimento è stata tendenzialmente (benché non significativamente) maggiore nella tesi Alta proteina ed i due fattori han fatto sì che l’indice di conversione sia risultato significativamente migliore nella tesi Alta proteina. L’ingestione è stata

apparentemente maggiore nei maschi che nelle femmine. Nella fase a terra, in cui l'alimento era razionato, non sono state rilevate differenze fra le due tesi (Tab. 5)¹.

Tabella 4: Prestazioni produttive medie individuali da inizio prova a messa a terra, e significatività della differenza fra dieta ad alta e bassa proteina. Le pesate dei suinetti sono state fatte individualmente ma, per il confronto statistico fra livelli proteici, sono stati usati i valori medi di postazione (n=6, per trattamento). AMG: accrescimento medio giornaliero; IMG: ingestione media giornaliera; IC: indice di conversione alimenti

Parametro	ALTA PROTEIN A	BASSA PROTEIN A	Significati vità di F	Maschi	Femmine	Significati vità di F
<i>Accrescimento medio giornaliero (g)</i>						
Da inizio prova a cambio dieta	377	313	P<0,01	353	337	n.s.
Da cambio dieta a messa a terra	599	593	n. s. (P=0,055)	614	578	P<0.05
Da inizio prova a messa a terra	479	440	P<0,05	472	447	n.s.
<i>Ingestione media giornaliera (g)</i>						
Da inizio prova a cambio dieta	585	536	n.s.	574	546	n.s.
Da cambio dieta a messa a terra	1181	1138	n.s. (P=0,057)	1212	1107	P<0.05
Da inizio prova a messa a terra	857	810	n.s.	865	802	n.s.
<i>Indice di conversione(-/-)</i>						
Da inizio prova a cambio dieta	1,55	1,72	P<0,01	1,63	1,63	n.s.
Da cambio dieta a messa a terra	1,97	1,92	n.s.	1,97	1,92	n.s.
Da inizio prova a messa a terra	1,79	1,84	P<0,05	1,83	1,80	n.s.

Tabella 5: Prestazioni produttive medie dalla messa a terra a fine prova, e significatività della differenza fra dieta ad alta e bassa proteina (n=6 per trattamento). Le pesate dei suinetti sono state fatte individualmente ma, per il confronto statistico fra livelli proteici, sono stati usati i valori medi di postazione (n=6, per trattamento) (¹). AMG: accrescimento medio giornaliero; IMG: ingestione media giornaliera; IC: indice di conversione alimenti

Parametro	ALTA PROTEIN A	BASSA PROTEIN A	Significati vità di F	Maschi	Femmine	Significati vità di F
<i>Accrescimento medio giornaliero (g)</i>	457	437	n. s.	453	441	n.s

¹ I pesi medi per trattamento sono riportati in Tab. S2.

<i>Ingestione media giornaliera (g)</i>	952	952	n. s.	952	952	n.s
<i>Indice di conversione(-/-)</i>	2,11	2,18	n. s.	2,12	2,17	n.s

⁽¹⁾ A causa della comparsa della sindrome “Malattia degli edemi”, che ha colpito in forma grave tre suinetti della tesi “ALTA PROTEINA” nei giorni 1 e 2 gennaio 2020 determinando la morte di due suinetti e l’irrimediabile compromissione del sensorio del terzo, in questa tesi sono stati utilizzati i dati di 69 anziché di 72 suinetti

Stato sanitario

A fare da contraltare alle prestazioni produttive c’è lo stato di salute degli animali. Le diarree sono comparse nella seconda metà di novembre, prima della messa a terra e prima del cambio dieta (**Tab. S3**). La prima evidenza (**Tab. 6**) è che le diarree si sono concentrate nei primi 25 giorni in gabbia (fino al cambio di mangime) con il 45.7% del punteggio totale e negli ultimi 24 giorni a terra, con il 51.7% del totale. Si confermano così ancora una volta i due principali fattori di stress per i suinetti: lo svezzamento e la messa a terra. La seconda evidenza è il grande effetto del livello proteico dell’alimentazione: in tutta la prova l’incidenza complessiva delle diarree nella tesi a bassa proteina è stata del 28.6% del totale, e nella tesi ad alta proteina il rimanente 71.4%. L’effetto del livello proteico è stato sempre evidente: nel primo periodo in gabbia le diarree nella tesi a bassa proteina sono state il 15.0% del totale, in gabbia dopo il cambio di mangime sono state il 16.7%, mentre nel periodo a terra sono salite al 41.3%, comunque meno del 58.7% della tesi ad alta proteina. La terza ed ultima evidenza, appena appannata dalla possibile confusione con la collocazione delle gabbie, è stata data dal sesso, con i maschi più soggetti a diarree delle femmine (60.3%% contro il 39.7%). L’effetto del sesso è stato praticamente costante in tutti i periodi. Infine è da supporre che l’effetto della dieta sia sottostimato, in quanto gli animali affetti da diarrea sono stati curati e lasciati nella loro postazione.

Tabella 6. Sommatorie dei punteggi di diarrea verificatisi durante la crescita dei suinetti, in funzione di trattamento e sesso.

Fase di crescita	Alta proteina			Bassa proteina			Punteggio totale (alta+bassa proteina)
	Maschi	Femmine	Somma	Maschi	Femmine	Somma	Somma
Da inizio prova a cambio dieta	53	38	91	14	2	16	107
Da cambio dieta alla messa a terra ⁽¹⁾	3	2	5	0	1	1	6
Dalla messa a terra a fine prova ⁽²⁾	35	36	71	36	14	50	121
Somma	91	76	167	50	17	67	234

⁽¹⁾ Feci di normale consistenza dal 07/11/19 al 19/11/19 e dal 05/12/19 al 23/12/19 (vedi **Tab. S3**)

⁽²⁾ Feci di normale consistenza dal 24/12/19 al 27/12/19 e dal 12/01/20 al 16/01/20 (vedi **Tab. S4**)

In particolare, a partire dal dodicesimo giorno di prova (**Tab. S3**), in tutti i box nella tesi Alta proteina si è notata una scarsa consistenza delle feci, inizialmente estesa a tutto il box in tre box su sei e che poi si è progressivamente ridotta, presumibilmente grazie agli interventi terapeutici (**Tab. S1**) fino a scomparire dopo il 4 dicembre. È impossibile fare ipotesi sul fatto che in mancanza di interventi terapeutici l'evoluzione sarebbe stata egualmente positiva o sarebbe andata verso una forma più grave di diarrea; quello che è certo è che il mangime Alta proteina, complice anche una ingestione tendenzialmente maggiore, ha stimolato una maggiore motilità intestinale, fatto che indubbiamente predispone all'instaurarsi di forme patologiche. Nella fase più critica del post-svezzamento, cioè il passaggio a terra, si è verificata (dopo cinque giorni) la comparsa di diarrea conclamata (punteggio 4 o superiore) in quattro box su sei della tesi Alta proteina e in uno su sei della tesi Bassa proteina (**Tab. S4**); per questo si è deciso di ricorrere alla terapia di massa per via orale.

Composizione del microbiota

Con il sequenziamento è stato possibile classificare circa il 90% degli OTUs (**Fig. 4**).

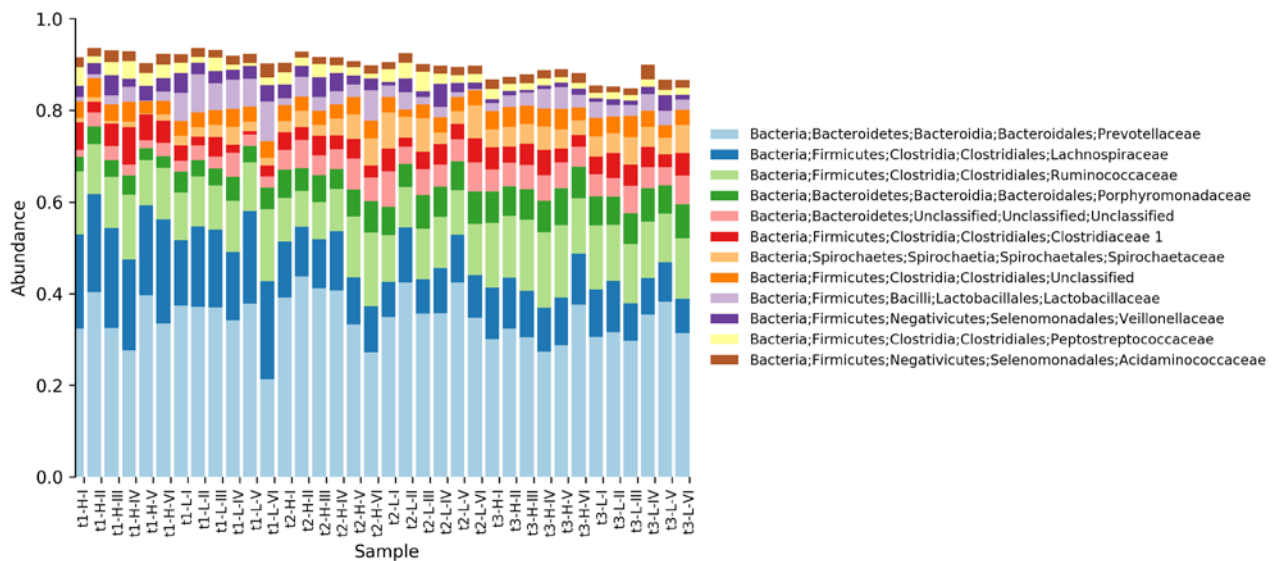


Figura 4: abbondanza relativa delle famiglie batteriche rinvenute nei campioni di feci raccolti al primo, secondo e terzo campionamento (rispettivamente: t1, cambio dieta; t2, messa a terra; t3, fine prova) da suinetti alimentati ad alta (H) o bassa (L) proteina. La numerazione I_VI indica le repliche. Il grafico include le 12 famiglie più rappresentate, mentre quelle meno abbondanti, che cioè ricorrono con bassa frequenza, sono incluse nella parte alta incolore di ogni istogramma.

Le famiglie batteriche più rappresentate (>60% degli OTUs) erano: *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Porphyromonadaceae*. In letteratura queste famiglie ricorrono nelle feci di suinetti sani e sani trattati con antibiotici (Guevarra et al., 2019; Gresse et al., 2017).

La percentuale complessiva di OTUs a bassa incidenza (zona incolore del grafico) è aumentata nel tempo, a scapito di quelle inizialmente più abbondanti. Quindi con l'età è aumentata la biodiversità del microbiota, in accordo con quanto osservato da altri autori (Wang et al., 2019).

I fattori di variazione che hanno influenzato maggiormente la composizione del microbiota sono stati l'età dei suinetti e il periodo di alimentazione. Precisamente, la biodiversità è aumentata dopo il cambio di dieta (**Fig. S1**) e con l'età (**Fig. S2**), mentre è stata poco influenzata dal livello proteico nella dieta (**Fig. S3**). Il fattore “sala” denota l'ubicazione dei suinetti durante la crescita. Tra le sale 1 e 3 (**Fig. S4**) non c'era differenza nel numero di specie rilevate (Observed), ma c'erano differenze nei rapporti relativi, forse dovute alla differenza di sesso (maggior biodiversità nelle femmine?). Il passaggio allo stabulario ha comportato un aumento di uniformità del microbiota. Questo fattore

peraltro si sovrappone a quello dell'età dei suinetti. I fattori gabbia e replica campionaria non hanno avuto nessun effetto sul microbiota, come peraltro atteso.

Benchè dall'esame dell'alfa-diversità non siano emerse differenze sostanziali riferibili al livello proteico nella dieta, tuttavia nell'analisi delle coordinate principali i campioni di feci dei suinetti a bassa proteina e di quelli ad alta proteina risultavano relativamente raggruppati (**Fig. 5**).

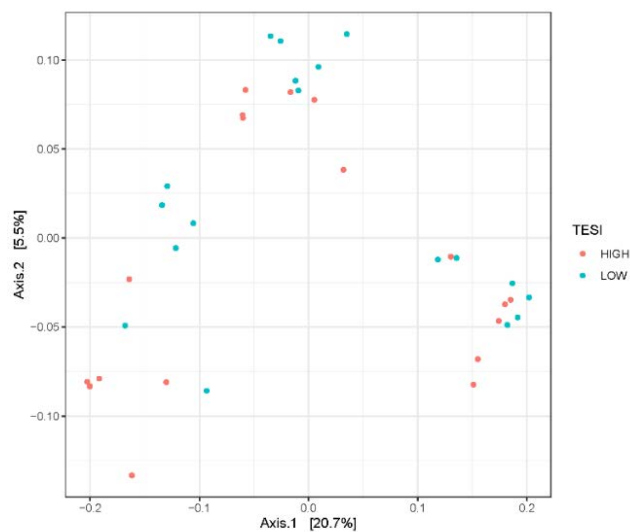


Figura 5. Analisi delle Coordinate principali con raggruppamento dei campioni di feci in base al trattamento. Punti rossi: da suinetti con dieta ad alta proteina; punti blu: da suinetti con dieta a bassa proteina

Per capire le ragioni di raggruppamento è stata esaminata più in dettaglio la numerosità degli OTUs delle famiglie dominanti e minori. Nell'ambito delle famiglie dominanti (**Fig. 5**) le uniche differenze legate al trattamento sono state nel primo campionamento a carico delle *Clostridiaceae*, più abbondanti in H che in L ($P > 0.0001$, $\alpha = 0.05$), e delle *Lactobacillaceae*, più abbondanti in L che in H ($P = 0.0037$, $\alpha = 0.05$). Queste differenze non erano più percepibili nei campionamenti successivi. Nell'ambito delle famiglie meno abbondanti (**Fig. S5**) differenze significative dovute alla dieta sono state rilevate per *Succinivibrionaceae*, *Fibrobacteraceae* e *Sutterellaceae*. Queste famiglie erano più abbondanti in L che in H in tutti e 3 i campionamenti (**Tab. 7**): modelli significativi per i fattori principali: tempo e trattamento, ma non per l'interazione).

Tabella 7. Abbondanza relativa in funzione della fase di crescita dei suinetti e del livello proteico nella dieta per 3 famiglie batteriche selezionate. Significato delle sigle: t1, campionamento al cambio dieta; t2, alla messa a terra; t3, a fine prova. H: dieta ad Alta proteina; L: dieta a Bassa proteina.

Tempo	Succinivibrionaceae				Fibrobacteraceae				Sutterellaceae			
	H	L	<i>media</i>		H	L			H	L		
t1	164	469	316	a	65	134	100	b	6.5	26.8	17	b
t2	450	547	498	a	172	317	245	a	40.7	57.5	49	a
t3	194	483	338	a	156	231	193	a	39.3	48.3	44	a
<i>media</i>	269b	500a			131b	227a			28.8b	44.2a		

In questo esperimento la frequenza delle *Enterobacteriaceae* è stata molto bassa in tutti i campioni (0.14%) e anche molto variabile tra repliche, e non è stata individuata alcuna relazione con quella delle *Lactobacillaceae*, una delle famiglie dominanti (3%).

Che il microbiota del suino cambi con l'età è cosa nota. (Han et al., 2018; Wang et al., 2019). Svariati fattori sono riportati influenzare il microbiota intestinale dei suinetti post svezzamento e predisporre, o proteggere da, fenomeni di PWD (Rist et al., 2013; Gresse et al., 2017). In genere i risultati in letteratura si riferiscono a suinetti appositamente stressati o più giovani di quelli di prova, oppure il microbiota è quello dell'apparato intestinale, diverso da quello fecale (Pollock et al., 2019). Nel nostro caso abbiamo considerato il microbiota delle feci di suinetti cresciuti in condizioni protette, che sono quelle più probabili negli allevamenti reali. Questa protezione si esplica sia a livello ambientale (attenzione all'assenza di cause di stress) sia sanitario (interventi preventivi con farmaci). È quindi atteso che nelle feci dei nostri suinetti le *Enterobacteriaceae* fossero poco rappresentate, e che ci fossero invece molti lattobacilli.

Benchè risulti un aumento complessivo di alfa diversità a carico dei suinetti a Bassa proteina dopo la messa a terra (**Fig. S2**), questa maggior biodiversità non sembra la causa delle differenze nell'incidenza di PWD tra dieta a bassa ed ad alta proteina: siccome nei suinetti alimentati a Bassa proteina l'incidenza delle diarree è stata inferiore già prima del primo campionamento di feci per l'analisi molecolare (prima cioè del cambio dieta e della messa a terra: (**Tab. 6** e **Tab. S3**) questo

implica che questi suinetti avevano acquisito minore suscettibilità alle diarree già in questa fase precoce. La maggior presenza di *Lactobacillaceae* può essere stato un fattore determinante. Anche la maggior frequenza di *Succinivibrionaceae* (gen. *Succinivibrio*), *Fibrobacteraceae* (gen *Fibrobacter*) e *Sutterellaceae* (gen. *Sutterella*) nelle feci dei suinetti a dieta con bassa proteina potrebbe essere in qualche modo messa in relazione con la loro minor suscettività a PWD. Dou et al. (2017) hanno osservato una prevalenza delle famiglie *Prevotellaceae*, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* e *Lactobacillaceae* nei suinetti sani, rispetto a quelli che poi avrebbero manifestato diarrea. Argüello et al. (2019), invece, avendo osservato che batteri cellulosolitici (*Ruminococcus* e *Prevotella*) erano più abbondanti nei suinetti non infetti mentre quelli infetti con *Salmonella* presentavano una maggior abbondanza di *Lactobacillus* e *Oscillospira*, sostengono che un microbiota non maturo, con maggiore proporzione di microorganismi legati alla fase di allattamento, possa aumentare la suscettibilità all'infezione. Gli stessi autori hanno trovato nei suinetti sani una maggior abbondanza di *Sutterella*, e sostengono che questo genere possa avere un ruolo nello stimolo di una risposta d'immunità. Yang et al. (2020) hanno confrontato il microbiota di suinetti sani e quello di suinetti diarroici in 3 fasi di crescita: allattamento, fase intermedia e svezzamento (dieta solida per suinetti) e hanno notato che, col passaggio all'alimentazione solida, calava l'incidenza di *Lactobacillus* ed *Escherichia coli*, mentre aumentava quella di *Prevotella* e hanno messo in relazione a fenomeni di PWD una riduzione di *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Bulleidia* e *Treponema*, responsabili della digestione dei cibi solidi, e un calo dei geni coinvolti nel metabolismo dei carboidrati. Una maggior incidenza di *Succinivibrio* è stata riscontrata nel colon di suinetti in dieta a bassa proteina da Zhao et al. (2020).

A minore incidenza di turbe gastrointestinali ha fatto comunque da contraltare una riduzione delle prestazioni produttive, in termini di ingestione volontaria di alimento, di accrescimenti giornalieri e di resa del mangime; i suinetti del gruppo alta proteina avevano, dopo 70 giorni di prova, un peso di circa 2 kg superiore a quello dei suinetti della dieta bassa proteina.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Con la presente ricerca si conferma quanto già rilevato in letteratura, e cioè che una riduzione del tenore proteico dei mangimi può ridurre la comparsa e la gravità di sindromi gastroenteriche dei suinetti in coincidenza con fasi particolarmente stressanti di allevamento (allontanamento dalla madre, messa a terra). Lo stress riduce la capacità del suinetto di digerire l'alimento somministrato, e fornisce un *pabulum* per proliferazioni batteriche indesiderate, dalle quali inizia la catena di eventi che conduce all'alterazione della barriera intestinale dalla quale conseguono diarrea, disidratazione ed assorbimento di tossine batteriche.

Le variazioni del microbiota sono in larga parte determinate dalla fase di crescita, a sua volta associata all'evoluzione della dieta. Tuttavia, il diverso livello proteico a parità di età ha causato lievi ma significative variazioni in alcuni componenti del microbiota intestinale. Che i microorganismi evidenziati nelle diete a basso tenore proteico possano essere considerati indicatori di minore suscettibilità a diarrea dei suinetti è da dimostrare con ulteriore ricerca; tuttavia la maggior incidenza di gruppi microbici fermentativi dei carboidrati e cellulosolitici (*Fibrobacter* in particolare); nel microbiota di suinetti ricevanti diete a basso tenore proteico, può essere associata ad una migliore digestione della dieta solida, e quindi ad una minore suscettibilità alle diarre.

Da questa esperienza emergono alcune conferme e alcuni interessanti spunti di approfondimento. Il primo di questi è se le differenze ponderali riscontrate nella prova si annullino nel corso delle successive fasi di accrescimento - ingrasso degli animali e, assodato questo, fino a che punto ci si può spingere con la riduzione del tenore proteico in fasi particolarmente critiche (primi 15 giorni dopo lo svezzamento, passaggi bruschi di ambiente) senza compromettere la successiva carriera produttiva. Il secondo spunto interessante è approfondire l'evoluzione del microbiota per individuare momenti nei quali un'analisi di questo possa fungere da indicatore dell'evoluzione dello stato di salute dell'apparato gastroenterico.

Il tutto deve essere inteso in funzione dell'ottimizzazione degli interventi terapeutici individuali e di massa al fine sia di migliorare la redditività di allevamento sia di ridurre i rischi di comparsa di fenomeni di antibiotico-resistenza.

Hanno contribuito all'impostazione del lavoro, alla realizzazione delle prove, all'elaborazione dei dati e alla stesura del testo: Buttazzoni L., Della Casa G., Faeti V., Marchetti R., Marchetto G.

San Cesario sul Panaro, 02/10/20

Il Responsabile scientifico dell'attività, per il CREA-ZA

Dott. Valerio Faeti



RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Argüello H, Estellé J, Leonard FC, Crispie F, Cotter PD, O'Sullivan O, Lynch H, Walia K, Duffy G, Lawlor PG, Gardiner GE. Influence of the Intestinal Microbiota on Colonization Resistance to *Salmonella* and the Shedding Pattern of Naturally Exposed Pigs. *mSystems*. 2019 Apr 23;4(2):e00021-19. doi: 10.1128/mSystems.00021-19.
- Dou S, Gadonna-Widehem P, Rome V, Hamoudi D, Rhazi L, Lakhal L, Larcher T, Bahi-Jaber N, Pinon-Quintana A, Guyonvarch A, Huërou-Luron IL, Abdennebi-Najar L. Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post-Weaning Diarrhoea. *PLoS One*. 2017 Jan 10;12(1):e0169851. doi: 10.1371/journal.pone.0169851.
- Fouhse J.M., Zijlstra Benjamin R.T., Willing BP The role of gut microbiota in the health and disease of pigs *Animal Frontiers* 6(3):30, DOI: 10.2527/af.2016-0031
- Gresse R., Chaucheyras-Durand F., Fleury M.A., Van de Wiele T., Forano E., Blanquet-Diot S., Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health, *Trends in Microbiology*, 25(10). 2017 851-873, <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.004>.
- Guevarra RB, Hong SH, Cho JH, et al. The dynamics of the piglet gut microbiome during the weaning transition in association with health and nutrition. *J Anim Sci Biotechnol*. 2018;9:54. doi:10.1186/s40104-018-0269-6
- Guevarra RB, Lee JH, Lee SH, et al. Piglet gut microbial shifts early in life: causes and effects. *J Anim Sci Biotechnol*. 2019;10:1. doi:10.1186/s40104-018-0308-3
- Han, G.G., Lee, J., Jin, G. *et al.* Tracing of the fecal microbiota of commercial pigs at five growth stages from birth to shipment. *Sci Rep* **8**, 6012 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24508-7>
- Pollock J, Hutchings MR, Hutchings KEK, Gally DL, Houdijk JGM. Changes in the Ileal, but Not Fecal, Microbiome in Response to Increased Dietary Protein Level and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Exposure in Pigs. *Appl Environ Microbiol*. 2019 Sep 17;85(19):e01252-19. doi: 10.1128/AEM.01252-19. PMID: 31324635; PMCID: PMC6752020.
- Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Beaudry, F. *et al.* Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand* **59**, 31 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0299-7>
- Rist VT, Weiss E, Eklund M, Mosenthin R. Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: a review. *Animal*. 2013 Jul;7(7):1067-78. doi: 10.1017/S1751731113000062.
- Wang, X., Tsai, T., Deng, F. *et al.* Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome* **7**, 109 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0721-7>
- Yang Q, Huang X, Wang P, Yan Z, Sun W, Zhao S, Gun S. Longitudinal development of the gut microbiota in healthy and diarrheic piglets induced by age-related dietary changes. *Microbiologyopen*. 2019 Dec;8(12):e923. doi: 10.1002/mbo3.923.
- Zhao, Y., Tian, G., Chen, D., Zheng, P., Yu, J., He, J., Mao, X., Huang, Z., Luo, Y., Luo, J., & Yu, B.. Dietary protein levels and amino acid supplementation patterns alter the composition and functions of colonic microbiota in pigs. *Animal Nutrition*, 6, 143 - 151 (2020).

APPENDICE

INFORMAZIONI SUPPLEMENTARI

Tabella S1. Numero degli interventi di trattamento dei suinetti per diarrea con terapia parenterale, dalla comparsa delle diarree e fino alla messa a terra (in sala 1 i maschi, in sala 3 le femmine). Alla messa a terra ha fatto seguito un trattamento orale di massa.

	ALTA PROTEINA						BASSA PROTEINA					
	Sala 1			Sala 3			Sala 1			Sala 3		
ID_GABBIA	1	2	3	1	2	3	6	7	8	6	7	8
19/11/2019				5			1					
20/11/2019	12	12			5							
21/11/2019	12	12	12		4	2	1					
22/11/2019	7	5	6	2	3	2	5				2	3
23/11/2019	12	7	5	1	3	3	1				2	2
24/11/2019	4	6	1	7	3	3	12	1	1			4
25/11/2019	1	5	6	3	1	2	4	3				
26/11/2019	3		1	2	3	1			1			
27/11/2019	2	2	5	5	2	2			1			
28/11/2019	4	5		1	3	4			3			
29/11/2019	2		2	1	3	3		1	1			
30/11/2019	1	3			3							
01/12/2019		6	1		2	1			1			
02/12/2019						1						
Sommatoria dei trattamenti	162			86			37			13		

Tabella S2. Peso medio dei suinetti alle date di pesata: 07/12/19 (inizio prova), 02/12/19 (cambio dieta), 23/12/19 (messa a terra), 16/01/20 (fine prova), e significatività della differenza fra dieta ad alta e bassa proteina.

		ALTA PROTEINA	BASSA PROTEINA	Significativi tà di F	Maschi	Femmine	Significativi tà di F
Suinetti	n	72	72				
Peso medio a inizio prova	kg	7,80	7,77	n. s.	7,88	7,69	n. s.
Peso medio al cambio dieta	kg	17,23	15,59	n. s.	16,71	16,11	n. s.
Peso medio alla messa a terra	kg	29,82	28,03	n. s.	29,61	28,24	n. s.
Peso a fine prova ⁽¹⁾		40,72	38,52	n. s.	40,45	38,78	n. s.

⁽¹⁾ A causa della comparsa della sindrome “Malattia degli edemi”, che ha colpito in forma grave tre suinetti della tesi “ALTA PROTEINA” nei giorni 1 e 2 gennaio 2020 determinando la morte di due suinetti e l’irrimediabile compromissione del sensorio del terzo, in questa tesi sono stati utilizzati i dati di 69 anziché di 72 suinetti

Tabella S3. Punteggi di diarrea (vedi Tab. 3) registrati da inizio prova fino alla messa a terra (animali nelle gabbie; in sala 1 i maschi, in sala 3 le femmine).

	ALTA PROTEINA						BASSA PROTEINA					
	Sala 1			Sala 3			Sala 1			Sala 3		
ID_GABBIA	1	2	3	1	2	3	6	7	8	6	7	8
Feci di normale consistenza dal 07/11/19 al 19/11/19												
19/11/2019				2								
20/11/2019	3	3			2							
21/11/2019	3	3	3		2	1						
22/11/2019	2	2	2	1	1	1	2					1
23/11/2019	3	2	2	1	1	1	1					1
24/11/2019	1	1	1	1	1	1	3	1	1			
25/11/2019	1	2	1	1	1	1	1	1				
26/11/2019	1	1	1	2	1	1			1			
27/11/2019	1	1	2	2	1	1			1			
28/11/2019	1	2		1	1	1			1			
29/11/2019	1		1	1	1	1			1			
30/11/2019		1			1							
01/12/2019	1	2		1	1	1						
02/12/2019*	1		1			1						
03/12/2019	1	1	1			1						1
04/12/2019						1						
Feci di normale consistenza dal 05/12/19 al 23/12/19												
Sommatoria dei punteggi	56			40			14			3		

* Data cambio dieta

Tabella S4. Punteggi di diarrea (vedi Tab. 3) registrati dalla messa a terra fino a fine prova (animali nei box) (Box # 50, 52, 54, 73, 75, 77: maschi; box # 56, 58, 60, 79, 81, 83: femmine).

	Alta proteina						Bassa proteina					
ID_BOX	50	52	54	56	58	60	73	75	77	79	81	83
Feci di normale consistenza dal 24/12/19 al 27/12/19												
28/12/2019	2	6		4	6	5	4	2	1	1	1	2
29/12/2019	2	2	1	1		1	1	1	1			
30/12/2019	2	2	1	1		1	2	2	1		1	
31/12/2019	2	1	1	1	1	2	1	2	1		2	
01/01/2020		1			1	2		1	1	1		
02/01/2020	1	1	1	2	1	2		2	1	1	1	
03/01/2020	1	2	1	1		2	1	2	2		1	
04/01/2020			1			1		1	1		1	
05/01/2020												
06/01/2020												
07/01/2020			1					1				
08/01/2020												
09/01/2020			1					1	1			
10/01/2020		1	1			1		1	1			1
11/01/2020											1	
Feci di normale consistenza dal 12/01/20 al 16/01/20												
Sommatoria dei punteggi	35			36			36			14		

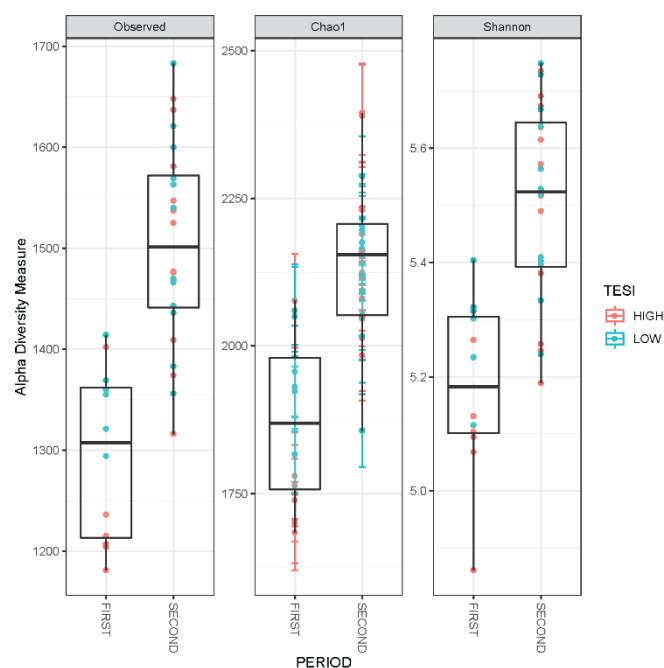


Figura S1: Box plot per il fattore “Periodo” di dieta. Nel primo periodo la dieta era mediamente più proteica che nel secondo. In rosso i campioni di feci da suinetti alimentati ad alta proteina, in blu a bassa.

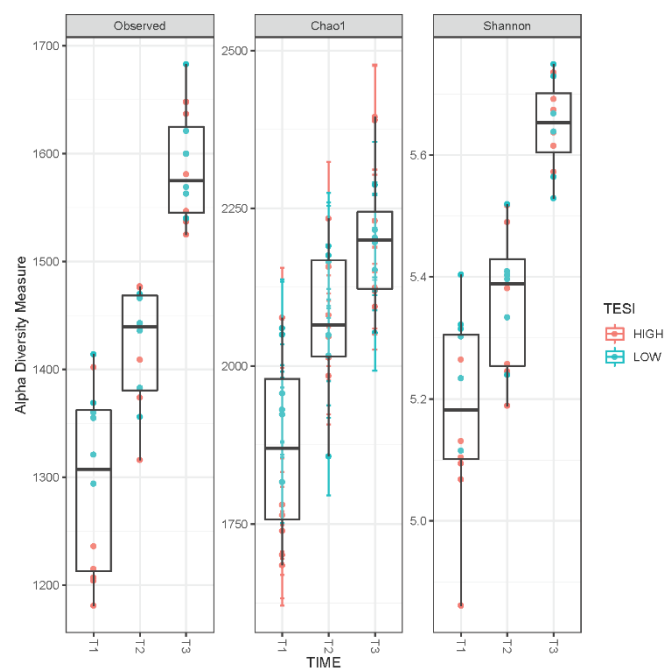


Figura S2: Box plot per il fattore “Data di campionamento”, cui corrisponde una diversa età dei suinetti. t1: 50 giorni (fine del primo periodo di dieta); t2: 71 giorni (nel giorno del passaggio a terra); t3: 95 giorni (fine svezzamento). In rosso i campioni di feci da suinetti alimentati ad alta proteina, in blu a bassa.

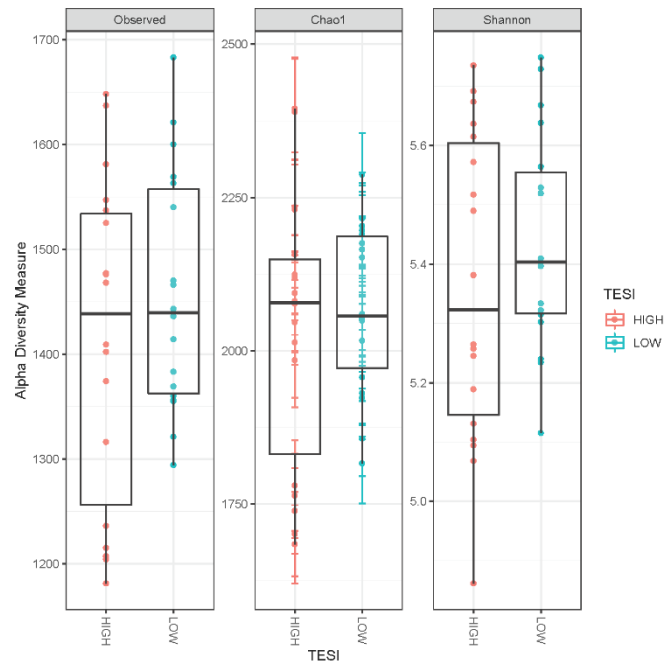


Figura S3: Box plot per il fattore “Tesi”. In rosso i campioni di feci da suinetti alimentati ad alta proteina (H), in blu a bassa (L).

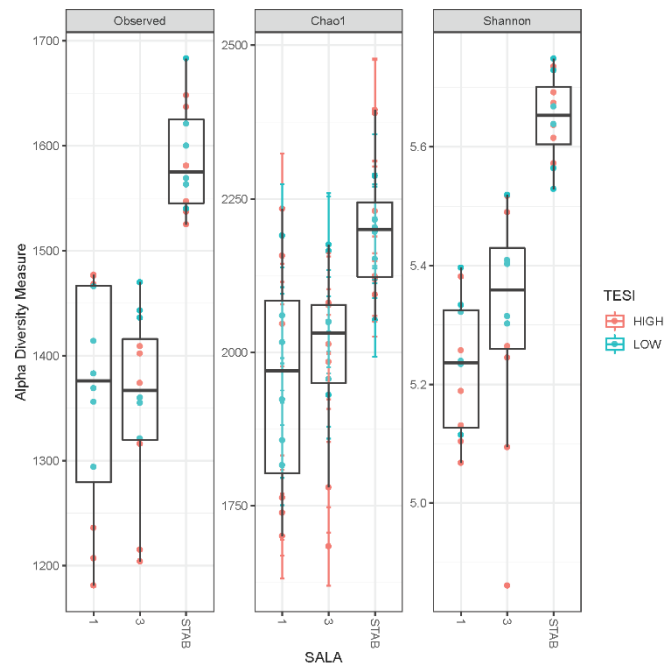


Figura S4: Box plot per il fattore “Sala”, cui corrisponde una diversa ubicazione dei suinetti. 1: sala 1, ha ospitato i suinetti maschi fino alla messa a terra; 3: sala 3, ha ospitato i suinetti femmina fino alla messa a terra; nel terzo campionamento tutti i soggetti sono passati nei box in altro ambiente (stab=stabulario). In rosso i campioni di feci da suinetti alimentati ad alta proteina, in blu a bassa.

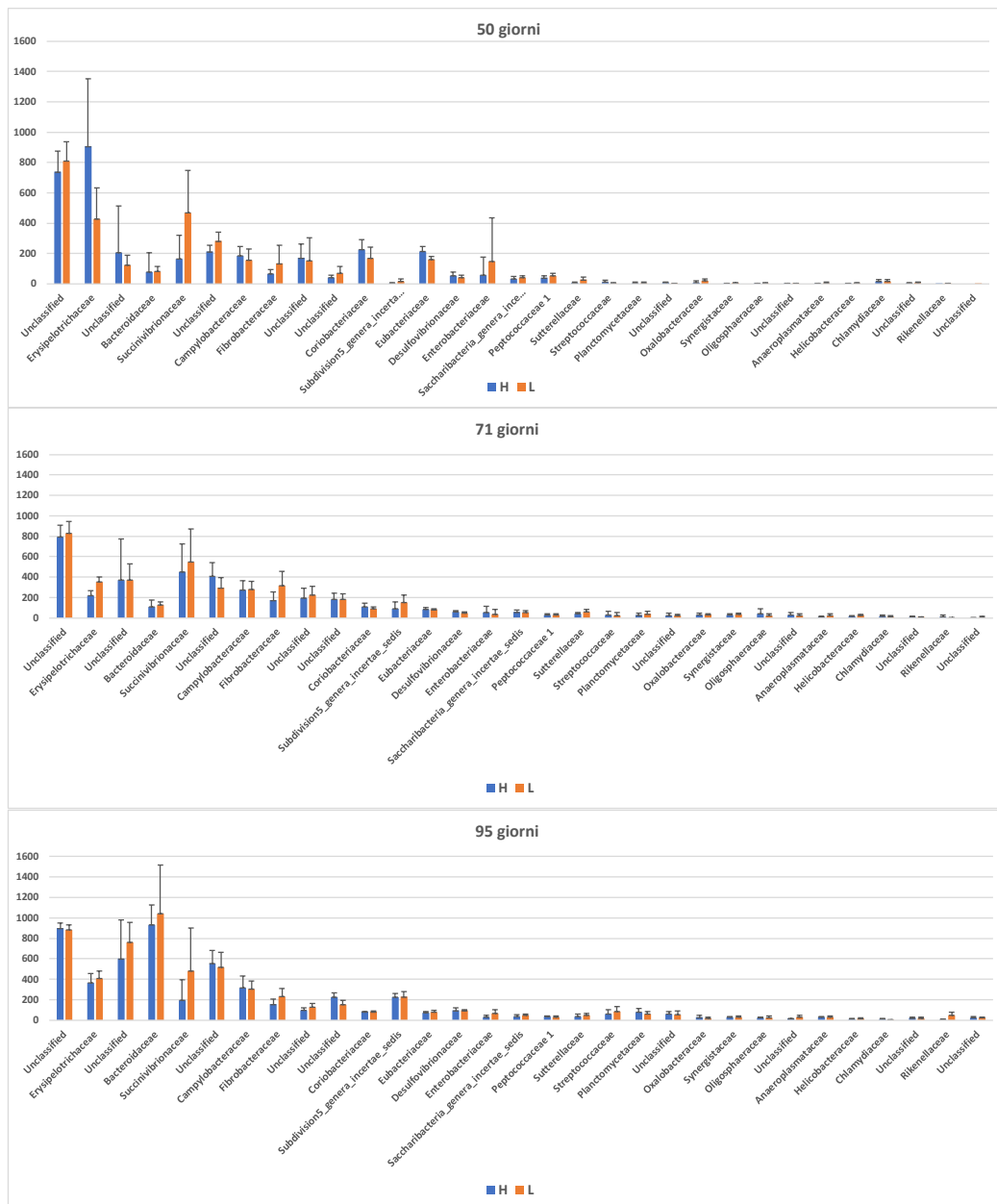


Figura S5: Numero di reads (medie e deviazioni standard; n=6) degli OTUs delle famiglie meno frequenti, in funzione della dieta (H= alta proteina; L: bassa proteina) nei 3 campionamenti: al cambio dieta, messa a terra e fine prova, realizzati rispettivamente a 50, 71 e 95 giorni di età dei suinetti.