

# MICROBIOMA ORALE DELLE SCROFE

## ORAL MICROBIOME OF SOWS

HATTAB J.<sup>1</sup>, MARRUCHELLA G.<sup>1</sup>, PALLAVICINI A.<sup>2</sup>, GIONECHETTI F.<sup>2</sup>,  
MOSCA F.<sup>1</sup>, TRACHTMAN A.R.<sup>1</sup>, LANCI L.<sup>1</sup>, GABRIELLI L.<sup>3</sup>, TISCAR G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo, Italia <sup>2</sup>Università di Trieste, Dipartimento di Scienze della Vita, Italia; <sup>3</sup>Medico Veterinario, Offida, Ascoli Piceno, Italia

**Parole chiave:** microbioma orale, scrofa, saliva

**Key words:** oral microbiome, sow, saliva

### RIASSUNTO

Il microbioma è l'insieme del materiale genetico appartenente ai microrganismi che condividono uno stesso habitat. Attraverso il microbioma è possibile conoscere le comunità che popolano determinati distretti corporei di essere umani e animali, le quali possono essere un indicatore di salute e il punto di partenza per la prevenzione di patologie. Il presente studio ha l'obiettivo di individuare il microbioma orale di scrofe sane, esistendo poca letteratura in merito. Il microbioma di 24 campioni è stato pertanto identificato tramite sequenziamento di parte del gene 16S rRNA e assegnazione delle varie sequenze a unità tassonomiche (OTU) sulla base di differenze e similitudini della regione ipervariabile V4 del gene 16S. I dati sono stati analizzati singolarmente e in seguito incrociati a seconda delle caratteristiche dei soggetti campionati (stato fisiologico, numero di parti). Dai risultati ottenuti è emersa una prevalenza dei generi *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Aerococcus* e *Clostridium*, mentre confrontando i vari gruppi non sono state evidenziate differenze significative. L'unica eccezione è stata rappresentata dai gruppi di gestazione e lattazione in cui, al livello di famiglie, Planococcaceae, Clostridiaceae e XI-02 sono risultati più abbondanti nelle gestanti, mentre le Micrococcaceae nelle scrofe in lattazione. Questi dati rappresentano un primo passo fondamentale nella conoscenza delle popolazioni microbiche del cavo orale della scrofa.

### ABSTRACT

Microbiome is the collective genome of the microorganism living in the same habitat. The identification of microbiome provides accurate information about the microbial communities in an individual, a key aspect in animal health and disease prevention. While pig gastrointestinal system's microbiome has been thoroughly investigated, little is known about oral microbiome composition. The aim of the present study is to outline healthy sow's oral microbiome. In total, 24 saliva samples were analyzed through part of 16S rRNA gene sequencing and allocated into operational taxonomic units (OTUs) based on the V4 hypervariable region of the gene. Data were examined both per sample and clustered according to sow physiological status, and parity. The main genera identified were *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Aerococcus* and *Clostridium*. The comparison between various taxonomic ranks and sow clusters outlined significant differences only at the family level. In particular, there was a prevalence of Planococcaceae, Clostridiaceae, and Family XI-02 in gestating with respect to lactating sows, and a prevalence of Micrococcaceae in lactating sows compared to gestating animals. The present data provide primary though important information on oral microbiome of sows, constituting the basis for further investigations.

## INTRODUZIONE

Con il termine “microbioma” si intende il genoma complessivo di tutti i microrganismi presenti in un determinato habitat, il quale può essere rappresentato anche da un altro organismo vivente o parte di esso (Gill et al., 2006). La composizione del microbioma di un distretto corporeo è strettamente connessa con lo stato di salute di un individuo. Pertanto, conoscerne la normale struttura è utile ai fini della prevenzione e del controllo di eventuali squilibri (He et al., 2015).

Ad oggi, sono stati eseguiti diversi studi sul microbioma intestinale del suino (Aluthge et al., 2019). Al contrario, i dati relativi al microbioma orale sono piuttosto esigui. Secondo la letteratura attualmente disponibile, le principali comunità microbiche del cavo orale del suino sono rappresentate dai generi *Streptococcus*, *Actinobacillus* e *Moraxella* (Murase et al., 2019; Bugenyi et al., 2020). Le indagini relative al microbioma tonsillare del suino hanno individuato un'importante presenza dei generi *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Moraxella* in suinetti seguiti dalla nascita allo svezzamento (Pena Cortes et al., 2018), e delle famiglie Pasteurellaceae, Moraxellaceae e Neisseriaceae nei suini in fase di ingrasso (Lowe et al., 2012). Microbioma orale e tonsillare sono considerati piuttosto simili nella specie umana (Segata et al., 2012), ma non è detto che ciò valga anche per le altre specie animali.

Sulla base di quanto sopra accennato, il presente studio si è posto l'obiettivo di aumentare le conoscenze in tema di microbioma orale del suino, con particolare riferimento al parco riproduttori.

## MATERIALI E METODI

### Animali

Il campionamento è stato effettuato presso un allevamento a ciclo chiuso di piccole dimensioni del Centro Italia. Il parco riproduttori era composto da circa 70 scrofe (ibridi commerciali) e 3 verri (Mora Romagnola). Tutti i suini oggetto di studio erano regolarmente vaccinati nei confronti della malattia di Aujeszky's (Aujeszky A-Suivax GI, FATRO S.P.A.), della colibacillosi e delle clostridiosi (SUISENG, Hipra).

### Modalità di campionamento

Nel periodo settembre-ottobre 2020 sono stati prelevati 24 campioni di fluido orale da altrettante scrofe (Tabella 1). Le scrofe venivano alimentate *ad libitum*, con mangime privo di sostanze antimicrobiche ma additivato con fermenti lattici (Yovis, ALFASIGMA). La saliva è stata prelevata con un apposito kit commerciale (PRRS check by Unistrain, Hipra), utilizzato secondo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati trasportati in laboratorio in un contenitore refrigerato, aliquotati in provette da 2 mL e stoccati a -69°C.

**Tabella 1.** Caratteristiche principali delle scrofe campionate

**Table 1.** Main Features Of Sampled Sows

Tipologia animali	Numerosità
Scrofette	2
Scrofe primipare	6
Scrofe pluripare	16
Scrofe in gestazione	10
Scrofe in lattazione	9

## Indagini biomolecolari

L'analisi dei campioni è stata eseguita presso il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste. Il DNA è stato estratto con il kit E.Z.N.A® Universal Pathogen (Omega Bio-Tek) a partire da 250 µl di saliva, ed eluito in 55 µL di tampone (incluso nel kit). L'estratto è quindi stato mantenuto a -20°C fino al suo utilizzo. Qualità e quantità del DNA estratto sono stati valutati tramite spettrofotometria (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific), ed è stata utilizzata come controllo negativo un'estrazione a vuoto per escludere eventuali contaminazioni degli estratti. In seguito, è stata effettuata l'amplificazione della regione V4 del gene 16S rRNA utilizzando i primer 515F, (Caporaso et al., 2011), 802R (Claesson et al., 2009) e 806R (Caporaso et al., 2011). Ai primer sono state abbinare sequenze diverse, ricche in CG, come codice a barre a fini identificativi. La prima PCR è stata eseguita in un volume di 20 µL, contenenti 10µL di AccuStartII PCR ToughMix 2X (Quanta Bio), 1µL EvaGreen™ 20X (Biotium), 0,8µL 515 F (10µM-5' modified with unitail 1 -CAGGACCAGGGTACGGTG-), 0,4 µL 802 R (10µM-5' modificato con una sequenza iniziale di 2-CGCAGAGAGGCTCCGTG-), 0,4µL 806 R (10µM-5' modificato con una sequenza iniziale di 2-CGCAGAGAGGCTCCGTG-), e 50 ng di DNA. L'amplificazione è stata eseguita con CFX 96™ PCR System (Bio-Rad) secondo il seguente protocollo: 94 °C for 20 s, 55 °C for 20 s, 72 °C for 60 s. La seconda PCR (PCR esterna) è stata effettuata per etichettare ogni campione in modo univoco, utilizzando un primer *forward* costituito da un adattatore 'A', un codice a barre campione-specifico da 10 paia di basi e dalla coda 1 dei primer utilizzati nella prima PCR. Il primer *reverse* era composto da un adattatore P1 e dalla coda 2. Le reazioni sono state eseguite in un volume di 25µL contenenti 12,5µL AccuStartII PCR ToughMix 2X (Quanta Bio), 1,25µL EvaGreen™ 20X (Biotium), 1,5µL primer corredato da codice a barre (10 µM), 1µL della prima PCR secondo il seguente protocollo: 8 cicli 94 °C per 10 s, 60°C per 10 s, 65 °C per 30 s e un'estensione finale di 72 °C per 2 min. La qualità e le dimensioni di tutti gli amplificati tramite elettroforesi su gel di agarosio, purificati con Mag-Bind® TotalPure NGS (Omega Bio -Tek), quantificati con Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) e raggruppati a seconda della molarità. Infine, la libreria è stata controllata con elettroforesi su gel di agarosio e quantificato con Qubit Fluorometer. Ai fini del sequenziamento, la libreria è stata per prima cosa sottoposta a ePCR con Sistema Ion OneTouch™ 2, utilizzando il modello Ion PGM™ Template Hi-Q OT2 View (Life Technologies) secondo le istruzioni del produttore. Infine, le Ion sphere particles (ISP) sono state arricchite tramite modulo E/S. Le ISP così ottenute sono state caricate e sequenziate con un chip Ion 316 (Life Technologies) con sistema Ion Torrent PGM.

## Analisi dei dati

Una volta ottenute le sequenze, queste sono state importate in CLC Microbial Genomics Module (CLC Genomics Workbench 20.0, QIAGEN Digital Insights, Aarhus, Denmark) e sottoposte a controllo qualità. Successivamente, sono stati rimossi gli adattatori e sono state escluse tutte le sequenze inferiori alle 150 paia di basi. Le sequenze sono state quindi assegnate a delle OTU in seguito al confronto con il database SILVA 16S v13297%, ne è stata ricostruita la tassonomia (*maximum likelihood phylogenetic tree*), ed è stata condotta un'analisi dell'alfa diversità. In questo modo è stato possibile osservare la composizione microbica e la variabilità media delle specie presenti in ciascun campione.

## Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il software Jamovi, verificando la normalità della distribuzione dei dati con il test di Shapiro-Wilk. Sono stati, quindi, impiegati il test T di *Student* ed il test U di *Mann-Whitney*, a seconda che la distribuzione dei dati fosse o meno normale.

## RISULTATI

Da ogni campione sono state ottenute 155,962-48,911 sequenze della regione V4 del gene 16S rRNA. Complessivamente, sono stati identificati oltre 100 filotipi. Gli ordini prevalenti nei campioni analizzati sono risultati appartenere ai phyla Firmicutes (Lactobacillales, Clostridiales, Bacillales and Erysipelotrichales), Actinobacteria (Corynebacteriales and Micrococcales), e Proteobacteria (Pseudomonadales), mentre delle 241 famiglie individuate, le più numerose riscontrate erano Corynebacteriaceae, Lactobacillaceae, Aerococcaceae, Moraxellaceae and Staphylococcaceae. Al livello di genere, è stata riscontrata un'alta numerosità di *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Aerococcus* and *Clostridium*. Dal confronto fra i vari gruppi e livelli tassonomici, non sono emerse differenze statisticamente significative ( $p > 0.05$ ). Esclusivamente tra i gruppi di scrofe gestanti e scrofe in lattazione sono stati individuati gruppi tassonomici prevalenti nell'una o nell'altra categoria. Infatti, al livello di famiglie, Planococcaceae, Clostridiaceae e XI-02 sono risultate essere più abbondanti nelle gestanti, mentre le Micrococcaceae più numerose nelle scrofe in lattazione.

## DISCUSSIONE

Nel corso degli ultimi anni, il microbioma orale è stato oggetto di attenzione crescente, soprattutto nell'uomo (Hillman et al., 2017) e sporadicamente nel bovino (Borsanelli et al., 2018), nel cavallo (Kennedy et al., 2016) e negli animali da compagnia (Rodrigues et al., 2019; Ruparell et al., 2020). Nel suino, i dati attualmente disponibili sono piuttosto esigui ed eterogenei (Murase et al., 2019; Bugenyi et al., 2020). I risultati delle nostre indagini divergono notevolmente da quanto disponibile in letteratura. Ciò è potenzialmente riferibile ad una serie di variabili, tutte meritevoli di ulteriore attenzione: età dei suini oggetto di studio, modalità di prelievo del fluido orale, integrazione del mangime con fermenti lattici, esposizione a sostanze antimicrobiche etc. Ad esempio, l'esposizione protratta a lincosamidi è stata recentemente messa in relazione con l'aumento relativo di *Clostridium*, *Aerococcus* e *Corynebacterium* (Jo et al., 2021), come in parte documentato anche nel nostro studio. Le differenze qui osservate fra scrofe lattanti e gestanti ricalcano quanto riportato in campo umano, sebbene restino da chiarire le ragioni di tali variazioni (Williams et al., 2019).

## CONCLUSIONI

Per quanto preliminari, i dati qui riportati offrono un utile contributo alla conoscenza del microbioma orale del suino, fornendo parametri di riferimento per indagini future. L'analisi di un numero crescente di campioni, associato ad un controllo più stringente delle variabili in gioco, consentirà di avere un quadro più solido del microbioma orale dei riproduttori e del significato pratico da attribuire ad eventuali variazioni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aluthge N.D., Van Sambeek D.M., Carney-Hinkle E.E., Li Y.S., Fernando S.C., Burkey T.E. (2019) "BOARD INVITED REVIEW: The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health1". J Anim Sci. 97(9):3741-3757.
2. Borsanelli A. C., Lappin D. F., Viora L., Bennett D., Dutra I. S., Brandt B. W., Riggio M. P. (2018) "Microbiomes associated with bovine periodontitis and oral health". Vet microbiol, 218, 1-6.
3. Bugenyi A.W., Cho H.S., Heo J. (2020) "Association between oropharyngeal microbiome and weight gain in piglets during pre and post weaning life". J Anim Sci Technol. 62(2):247-262.

4. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. (2011). "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4516-22.
5. Claesson M.J., O'Sullivan O., Wang Q., Nikkilä J., Marchesi J.R., Smidt H., De Vos W.M., Ross R.P., O'Toole P.W., (2009). "Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine". *PLoS One*,20;4(8):e6669.
6. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E. (2006) "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome". *Science.* 2;312(5778):1355-9.
7. He J., Li Y., Cao Y., Xue J., Zhou X. (2015) "The oral microbiome diversity and its relation to human diseases". *Folia Microbiol (Praha).* 60(1):69-80.
8. Hillman E. T., Lu H., Yao T., Nakatsu C. H. (2017) "Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract". *Microbes and environ,* 32(4), 300–313.
9. Jo H. E., Kwon M. S., Whon T. W., Kim D. W., Yun M., Lee J., Shin M. Y., Kim S. H., Choi H. J. (2021) "Alteration of Gut Microbiota After Antibiotic Exposure in Finishing Swine". *Front microbiol,* 12, 596002.
10. Kennedy, R., Lappin, D. F., Dixon, P. M., Buijs, M. J., Zaura, E., Crielaard, W., O'Donnell, L., Bennett, D., Brandt, B. W., & Riggio, M. P. (2016) "The microbiome associated with equine periodontitis and oral health". *Veterinary research,* 47, 49.
11. Lowe B.A., Marsh T.L., Isaacs-Cosgrove N., Kirkwood R.N., Kiupel M., Mulks M.H. (2012) "Defining the "core microbiome" of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs". *BMC Microbiol.* 7;12:20.
12. Murase K., Watanabe T., Arai S., Kim H., Tohya M., Ishida-Kuroki K., Vö T.H., Nguyễn T.P.B., Nakagawa I., Osawa R., Nguyễn N.H., Sekizaki T. (2019) "Characterization of pig saliva as the major natural habitat of *Streptococcus suis* by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbiota". *PLoS One.* 24;14(4):e0215983.
13. Pena Cortes L.C., LeVeque R.M., Funk J., Marsh T.L., Mulks M.H. (2018) "Development of the tonsillar microbiome in pigs from newborn through weaning". *BMC Microbiol.* 16;18(1):35.
14. Rodrigues M. X., Bicalho R. C., Fiani N., Lima S. F., Peralta S. (2019) "The subgingival microbial community of feline periodontitis and gingivostomatitis: characterization and comparison between diseased and healthy cats". *Sci rep,* 9(1), 12340.
15. Ruparell A., Inui T., Staunton R., Wallis C., Deusch O., Holcombe L. J. (2020) "The canine oral microbiome: variation in bacterial populations across different niches". *BMC microbiol,* 20(1), 42.
16. Williams J. E., Carrothers J. M., Lackey K. A., Beatty N. F., Brooker S. L., Peterson H. K., Steinkamp K. M., York M. A., Shafii B., Price W. J., McGuire M. A., McGuire M. K. (2019) "Strong Multivariate Relations Exist Among Milk, Oral, and Fecal Microbiomes in Mother-Infant Dyads During the First Six Months Postpartum". *J nutr,* 149(6), 902–914.
17. Segata N., Haake S. K., Mannon P., Lemon K. P., Waldron L., Gevers D., Huttenhower C., Izard, J. (2012) "Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples". *Genome biol.,* 13(6), R42.