

# CARENZA DI RIBOFLAVINA IN DUE AZIENDE BIOLOGICHE ITALIANE

## RIBOFLAVIN DEFICIENCY IN TWO ITALIAN ORGANIC FARMS

TORREGGIANI C.<sup>1</sup>, FRANCHI L.<sup>2</sup>, BORRI E.<sup>2</sup>, PROSPERI A.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER);

<sup>2</sup>Progeo, Italia;

**Parole chiave:** natimortalità, riboflavina, allevamento biologico

**Keywords:** Stillbirth, riboflavin, organic farming

### RIASSUNTO

Il caso clinico descritto nel presente studio ha interessato due allevamenti biologici, rispettivamente di 250 scrofe (allevamento A) e 320 scrofe (allevamento B) rispettivamente. Verso la fine dell'anno 2019 e inizio del 2020, in entrambe gli allevamenti, è stata rilevata una elevata incidenza di parti anticipati e nascita di suinetti disvitali o nati morti in assenza di segni clinici nelle scrofe. Negli ultimi mesi del 2019, attraverso la somministrazione di progestinici (110-111-112) la situazione ha mostrato un miglioramento ma nel corso del 2020 si è rilevato un ulteriore peggioramento che nell'ottobre del 2020 ha portato a registrare livelli di mortalità intra-nidiata dal 60% al 100%. In entrambe gli allevamenti la problematica è perdurata per tutto il 2020 portando rispettivamente alla perdita di 970 (allevamento A) e 1600 (allevamento B) suinetti. Esami di laboratorio condotti su campioni biologici prelevati in corso di esami necroscopici su suinetti, alimento e acqua di abbeverata, non hanno fornito risultati significativi. In letteratura alcuni studi riportano un importante ruolo della vitamina B2 sull'efficienza riproduttiva della scrofa. Nel presente caso, nonostante la carenza di riboflavina non sia stata dimostrata analiticamente, le manifestazioni cliniche, la quantità di riboflavina presente nell'alimento e l'efficacia dell'integrazione nella dieta di vitamina B2 hanno portato ad una diagnosi *ex juvantibus* di carenza da riboflavina.

### ABSTRACT

The clinical case in the current study affected two organic farms, composed of 250 sows (Farm A) 320 sows (Farm B) respectively. In both farms, towards the end of the year 2019 and the beginning of 2020, a high incidence of premature birth or stillborn piglets occurred. However, sows did not show clinical signs. In the last months of 2019, the administration of progestogens (110-111-112), showed an apparent initial improving, but this was not effective to solve the problem which persisted throughout 2020, reaching, during October 2020, an intra-litter mortality ranging from 60% to 100%. In both farms the problem led to the loss of 970 (farm A) and 1600 (farm B) piglets. Laboratory tests conducted on piglets, feed and water samples did not lead to significant results. There are scarce reports and information on the effects of riboflavin deficiency in pregnant sows, however some studies report an important role of vitamin B2 on the reproductive efficiency of the sow. Even though Riboflavin deficiency was not demonstrated analytically, the clinical presentation, the amount of vitamin B2 in feed and the effectiveness of riboflavin integration led to an *ex juvantibus* diagnosis of deficiency condition.

### INTRODUZIONE

La mortalità neonatale dei suinetti costituisce un grave problema nelle produzioni suinicole ed è caratterizzata da eziologia multifattoriale che colpisce sia l'economia aziendale sia il benessere

animale. Questa è associata a fattori di rischio infettivi e non-infettivi. Tra i fattori di rischio non infettivi si possono annoverare fattori genetici, materni, ambientali e fattori legati all'ospite (Vanderhaegeet al., 2013). Altrettanto rilevanti fattori di rischio sono il peso e le dimensioni dei suinetti alla nascita, nonché l'alimentazione materna che impatta direttamente sullo sviluppo fetale (Rangstrup-Christensen et al., 2017; Threadgold et al. 2021).

L'utilizzo di integratori nutrizionali durante la gestazione è una strategia utile per migliorare il benessere e la sopravvivenza dei suinetti alla nascita (Threadgold et al., 2021). Tra questi, la riboflavina è considerata indispensabile per le funzioni riproduttive. Nelle scrofe gravide, infatti, la carenza di riboflavina può portare a parti prematuri, natimortalità e mortalità nei primi giorni dopo la nascita (Frank et al., 1988).

Secondo alcuni autori, solo alcuni alimenti offrono un apporto sufficiente di riboflavina in grado di soddisfare le necessità nutrizionali dei suinetti. A tale proposito, bisogna ricordare che la dieta tipica dei suini, basata largamente sull'uso di cereali, ha spesso livelli di riboflavina bassi o borderline. Il ridotto aumento ponderale e l'indice di conversione dell'alimento sono segni di carenza di riboflavina in tutte le specie colpite (McDowell et al., 2000).

Il presente lavoro si pone come obiettivo quello di descrivere un caso clinico che ha interessato due allevamenti biologici che presentavano parti prematuri nelle scrofe, natimortalità e la nascita di suinetti disvitali e sottolineare come la carenza di riboflavina nella dieta, durante la fase di gestazione, sia un fattore da tenere in considerazione in caso di natimortalità o parti prematuri.

## **DESCRIZIONE DEL CASO**

Il caso clinico descritto nel presente studio ha interessato due allevamenti biologici, rispettivamente di 250 (allevamento A) e 320 scrofe (allevamento B). Nei due allevamenti, appartenenti allo stesso proprietario, veniva somministrato agli animali lo stesso mangime biologico. I due allevamenti presentavano status stabile per PRRSV, gestito in banda tri-settimanale e genetica Topig 20 e 60 con vero terminale Topig Fomeval1. Le due aziende avevano una produzione interna di scrofette GGP e GP. L'inseminazione seguiva il programma Topig.

Gli animali erano ubicati in recinto da parto (7,5X2 m) con scrofa libera, pavimento solido e presenza di paglia con temperatura del box parto di 21-22°C, mentre nel "nido" questa era mantenuta a 26-27°C.

Nell'allevamento A da marzo 2020 è comparsa una elevata incidenza di parti anticipati (3-4 giorni prima della data prevista del parto) nel 48% dei parti. Questo è stato osservato sistematicamente nei lotti successivi (il 30-40% delle scrofe ha mostrato un parto precoce). Ad agosto/settembre 2020, il 35,8% delle scrofe ha mostrato parto anticipato e il 20% delle scrofe secondipare ha manifestato nuovamente il problema. Le scrofe non presentavano segni clinici di rilievo così come non venivano osservati aborti o problemi di fertilità.

Nell'Allevamento B il problema è iniziato nell'ottobre 2019 quando alcune scrofe primipare hanno presentato parto prematuro (3-4 giorni prima della data prevista del parto), con nascita di suinetti disvitali o nati morti. La somministrazione di progestinici (110-111-112), da novembre a fine dicembre 2019, ha mostrato un significativo miglioramento. Una volta sospesa la somministrazione di progestinici, la situazione ha mostrato un'apparente normalizzazione e si sono fermati i casi di parto prematuro e di natimortalità. Nel corso del 2020 la situazione ha subito un nuovo peggioramento con parti prematuri delle scrofe ed elevata mortalità dei suinetti 15-24 ore dopo la nascita. Nel settembre 2020, i parti prematuri hanno interessato anche le scrofe di secondo e quarto parto, ma non le primipare. Nel mese successivo la mortalità intra-nidiata, coinvolgente 13 nidiate (numero di suinetti per nidiate da 15 a 22-23 suinetti) variava dal 60 al 100%.

In entrambe gli allevamenti la problematica è perdurata per tutto il 2020 portando rispettivamente alla perdita di 970 (allevamento A) e 1600 (allevamento B) suinetti.

## Indagini di laboratorio

Duecentotré suinetti nati morti o disvitali e deceduti poco dopo la nascita sono stati conferiti presso la sezione diagnostica dell'IZSLER di Parma e sottoposti ad esame necroscopico. Attraverso i dati anamnestici a disposizione e sulla base dei rilievi anatomopatologici 7 di questi erano nati morti ed i restanti erano morti poche ore dopo la nascita. All'esame necroscopico non si osservavano lesioni macroscopiche di rilievo a carico dei diversi organi e apparati. In sede necroscopica sono stati prelevati campioni da sottoporre ad indagini diagnostiche (**Tabella 1**).

L'esame culturale ha dato esito negativo per tutti i campioni analizzati così come le indagini condotte per la ricerca di PRRSV, PPV, PCV2, Enterovirus, SuHV-1, EMCV, APPV, *Chlamydia* spp., *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii*. Cinque su 13 pool di visceri sono risultati positivi per Sapelovirus. Tuttavia, bisogna ricordare che, secondo alcuni autori, Sapelovirus è stato associato a molte patologie che interessano principalmente l'apparato gastrointestinale, neurologico e riproduttivo, ma anche infezioni subcliniche; tuttavia, per la maggior parte dei sierotipi non è stato dimostrato un ruolo nel determinare forme cliniche (Stäubli et al., 2021). Campioni di Cervello, cervelletto, rene, milza, fegato, polmone, cuore e intestino sono stati prelevati per l'esame istopatologico e fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, successivamente sezionati al microtomo e colorati con ematossilina-eosina. L'esame istopatologico non ha mostrato alterazioni significative, non confermando il ruolo di Sapelovirus nel determinismo della problematica.

Gli esami di laboratorio condotti sull'alimento ed acqua di abbeverata non hanno mostrato risultati significativi. Il mangime somministrato alle scrofe è stato sottoposto ad indagini per evidenziare la presenza di Zearalenone ed altre micotossine, che hanno sempre evidenziato livelli assenti o non significativi. L'acqua di abbeverata proveniente dai pozzi aziendali è stata sottoposta ad indagini chimico-fisiche e microbiologiche senza presentare alterazioni significative.

**Tabella 1.** Esami di laboratorio effettuati e risultati

**Table 1.** Laboratory exams and results

| Esame di laboratorio             | Metodo  | Risultati                                      |
|----------------------------------|---|--|
| Esame culturale                  | Semina su Agar globuli e Gassner incubato a 37 °C per 48 ore  | Negativo                                       |
| PRRSV<br>PCR Real Time           | <i>Virotype</i> PRRS RT-PCR Kit (Kit Indical)   | Negativo                                       |
| PCV2<br>PCR Real Time            | Olvera et al., 2004   | Negativo                                       |
| EMCV PCR                         | (Bakkali Kassimi et al., 2002)  | Negativo                                       |
| Enterovirus<br>(Sapelovirus) PCR | La Rosa et al., 2006  | Positivi campioni di 5 pool/13 pool analizzati |
| PPV                              | Kim et al., 2001  | Negativo                                       |
| <i>Chlamydia</i> spp.            | Ehricht et al., 2006  | Negativo                                       |
| APPV PCR                         | Schwarz et al., 2017  | Negativo                                       |
| SuHV-1                           | Yoon et al., 2005   | Negativo                                       |
| <i>Leptospira</i> spp.           | Bediret al. , 2010  | Negativo                                       |
| <i>Toxoplasma gondii</i>         | Menotti et al., 2010  | Negativo                                       |
| Istologia                        | Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, in seguito a fissazione in formalina al 10% | Non rilevate lesioni significative             |

La valutazione della composizione del mangime ha mostrato un livello di Riboflavina di 1,25 mg/kg di dieta, rivelando una possibile carenza di Riboflavina (Vit. B2). Il livello dietetico di riboflavina attualmente raccomandato (NRC, 2012) per i suini in gestazione, infatti, è di 3,75 mg/kg di dieta (7,87 mg/giorno). Sulla base di questo sospetto l'integrazione di riboflavina attraverso somministrazione intramuscolare (per 3 giorni, 30 giorni prima del parto) e orale (per i successivi 30 giorni fino al parto) di 10 ml/scrofa di complesso vitaminico (3 mg/ml di riboflavina) nelle scrofe gestanti ha eliminato completamente il problema.

## **DISCUSSIONE**

La riboflavina gioca un ruolo essenziale nel rilascio di energia e nell'assimilazione di nutrienti; pertanto, la sua carenza può portare all'instaurarsi di diverse problematiche sanitarie caratterizzate da un'ampia varietà di sintomi. È importante sottolineare che gli animali non sono in grado di sintetizzare la riboflavina, perciò è necessario che questa venga introdotta attraverso la dieta. In letteratura (Cunha et al., 1977) sono riportati alcuni effetti della carenza da riboflavina, tra i quali, i sintomi nei suinetti in accrescimento comprendono anoressia, ritardo nella crescita, dermatiti, alopecia, difficoltà alla deambulazione, colite ulcerosa, infiammazione della mucosa anale, vomito, cataratta, fotofobia, opacità del cristallino, edema gelatinoso diffuso dei tessuti connettivi.

Nella grave carenza di riboflavina dei suini, i ricercatori hanno osservato neutrofilia, una diminuzione della risposta immunitaria, epatosi, e mielina degenerata dei nervi sciatico e brachiale (NRC, 1998).

In stati carenziali da riboflavina la riproduzione è compromessa, alcuni autori, tra cui Cunha et al., nel 1977, hanno elencato alcuni sintomi clinici che le scrofe possono presentare durante le fasi riproduttive e durante la lattazione se alimentate con una dieta carente di riboflavina. Questi sintomi prevedono perdita di appetito, scarso incremento ponderale, parto anticipato da 4 fino a 16 giorni, mortalità fetale, natimortalità e mortalità nelle prime ore successive al parto (entro 48 ore).

I suinetti nati morti possono presentare ipotricosi ed edema gelatinoso alle parti declivi (arti) o generalizzato. Ensminger et al. (1947) hanno riportato che la carenza di riboflavina è responsabile di parti prematuri, nascita di suinetti nati morti e mortalità neonatale.

Maggiore è la lunghezza del periodo in cui le scrofe vengono alimentate con alimenti poveri di riboflavina nella dieta, maggiore è la gravità delle manifestazioni cliniche. Inoltre, anche la dimensione dei suinetti può essere un fattore di rischio che può contribuire all'evoluzione del problema così come quella della nidiata. L'aumento delle dimensioni della nidiata è un fattore di rischio per la natimortalità (Rangstrup-Christensen et al., 2017). Una nidiata composta da un numero di suinetti >12 ha un rischio maggiore di presentare fenomeni di natimortalità (Cecchinato et al., 2008). Nel caso presentato, come riportato, si trattava di animali iperprolifici (numero di suinetti per nidiata da 15 a 22-23 suinetti) e questo può aver aggravato il quadro determinato dalla carenza di riboflavina.

Il fabbisogno di riboflavina può variare con le caratteristiche ambientali, l'età, l'attività fisica, il benessere, fattori ereditari e componenti dell'alimento stesso. Alcuni autori indicano che la necessità di riboflavina diminuisce con la maturità dell'animale mentre aumenta nelle fasi riproduttive (McDowell et al., 2008).

Le diete normalmente somministrate ai suini, basate in gran parte sull'impiego di cereali sarebbero spesso carenti di riboflavina. Un ridotto tasso di crescita e una minore efficienza alimentare sono quadri frequentemente osservabili in caso di carenza di riboflavina in tutte le specie animali colpite. È stata dimostrata una ridotta assunzione di mangime nelle scrofette a cui è stata somministrata una dieta per l'allattamento contenente 1,3 mg/kg di riboflavina. Queste scrofette consumavano il 30% in meno di mangime rispetto a quelle che ricevevano

diete con riboflavina da 2,3 a 5,3 mg/kg (Frank et al., 1988).

Bazer e Zavy (1988) hanno riferito che l'integrazione con 100 mg di riboflavina al giorno, forniti dal quarto al decimo giorno dopo l'inizio dell'estro, hanno determinato una maggiore dimensione della nidiate, sopravvivenza embrionale al giorno 30 di gestazione nelle scrofette e un aumento dei tassi di concepimento e più suini vivi alla nascita, al giorno 21 e 42 di lattazione nelle scrofe primipare. Pettigrew et al. (1996) hanno fornito nell'alimento 10 (controllo), 60, 110 o 160 mg di riboflavina al giorno, per 21 giorni dopo l'inseminazione. Sebbene l'integrazione con riboflavina tendesse ad aumentare la percentuale di scrofe al parto (66,7%, 85,7%, 93,3% e 86,7% rispettivamente per 10, 60, 110 e 160 mg di riboflavina al giorno), non è stato rilevato alcun effetto sulla dimensione della nidiate.

In questo caso clinico, nonostante la carenza di riboflavina non sia stata dimostrata dal punto di vista analitico, la manifestazione dei sintomi clinici, la quantità di vitamina B2 nell'alimento così come l'efficacia dell'integrazione di riboflavina nell'alimento hanno portato a una diagnosi *ex juvantibus* di condizione carenziale da riboflavina.

In questo studio si è voluto descrivere un caso clinico che ha interessato due allevamenti biologici che presentavano parti prematuri nelle scrofe, natimortalità e la nascita di suinetti disvitali e sottolineare che la carenza di riboflavina nella dieta durante la fase di gestazione è un fattore da tenere in considerazione in caso di natimortalità o parti prematuri.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bakkali Kassimi L., Gonzague M., Boutrouille A., Cruciere C. (2002) "Detection of Encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and on-estep RT-PCR", *Journal of Virological Methods* 101, p. 197–206.
2. Bazer, F. W., and Zavy, M. T.(1988) *J. Anim. Sci.* 66(Suppl. 1), 324
3. Bedir O., Kilic A., Atabek E., Kuskucu A.M., Turhan V., Basustaoglu A.C. (2010) "Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay", *Pol J Microbiol* 59: 167-73.
4. Cecchinato A., Bonfatti V., Gallo L. and Carnier P. (2008) "Survival analysis of pre-weaning piglet survival in a dry-cured hamproducing crossbred line", *Journal of Animal Science* 86, p. 2486-2495. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2007-0825>
5. Cunha, T. J. (1977) "Swine Feeding and Nutrition", Academic Press, New York
6. Ehricht R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. (2006) "Optimized DNA micro-array assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies", *Mol Cell Probes.*;20(1):60-3. doi: 10.1016/j.mcp.2005.09.003. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16330186.
7. Esminger M.E., Bowland J.P., Cunha T.J.(November 1947) "Observations on the Thiamine, Riboflavin, and Choline Needs of Sows for Reproduction", *Journal of Animal Science*, Volume 6, Issue 4, p. 409–423
8. Frank, G. R., Bahr, J. M., and Easter, R. A.(1984) *J. Anim. Sci.* 59, 1567.
9. Frank G. R., Bahr J. M., Easter R. A.(1988) "Riboflavin Requirement of Lactating Swine", *Journal of Animal Science*, Volume 66, Issue 1, Gennaio, p.47–52
10. Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Schirrmeier H., Depner K.(2005) "Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever", *J Virol Methods*, 130(1-2):36-44. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.05.030
11. Hughes, S. G., (1984) *J. Nutr.* 114, 1660
12. Kim J., Choi C., Han d.U., Chae C.(2001) "Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by Multiplex PCR", *The Veterinary Record*, 149, p. 304-305
13. La Rosa G, Muscillo M, Di Grazia A, Fontana S, Iaconelli M, Tollis M. (2006)

- “Validation of rt-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses”, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*, 53(6):257-65. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00955.x. PMID: 16907956.
14. Menotti J., Y. J et al.(2005) “Evaluation of a new 5’-nuclease real-time PCR Real-Time targeting the *Toxoplasma gondii* AF146527 genomic repeat”, *Clin Microbiol Infect*; 16: 363–368
  15. McDowell L.R. (2008) “Riboflavin”, In *Vitamins in animal and human nutrition*, Iowa State University Press, Ames, IA, USA , pp. 311-346
  16. NRC (1998) “Nutrient Requirements of Swine”, *Nutrient Requirements of Domestic Animals*. National Academy of Sciences-National Research Council, Washington, D.C, 10th Ed.
  17. NRC (2012) “ Nutrient Requirements of Swine”, 11th ed. National Academic Press, Washington. D.C., USA.
  18. Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M (2004) “Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a Real Time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs”, *J Virol Methods*. 117:75-80
  19. Pettigrew J. E., Yang H. (1997) “Protein nutrition of gestating sows”, *Journal of Animal Science*, Volume 75, Issue 10, Ottobre, p. 2723–2730
  20. Rangstrup-Christensen L., Krogh M. A., Pedersen L. J., Sørensen J. T. (2018) “Sow level risk factors for early piglet mortality and crushing in organic outdoor production”, *Animal*, 12:4, p. 810–818
  21. Rangstrup-Christensen L., Krogh M. A., Pedersen L. J., Sørensen J. T. (2017) “Sow level risk factors for stillbirth of piglets in organic sow herds”, *Animal*, 11:6, p. 1078-1083
  22. Schwarz L., Riedel C., Högl S., Sinn L.J., Voglmayr T., Wöchtel B., Dinhopf N., Rebel-Bauder B., Weissenböck H., Ladinig A., et al.(2017) “Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence”, *Vet. Res.*; 48:1. doi: 10.1186/s13567-016-0406-1.
  23. Stäubli T., Rickli C., Torgerson P.R., Fraefel C., Lechmann J. (2021) “Porcine teschovirus, sapelovirus, and enterovirus in Swiss pigs: multiplex RT-PCR investigation of viral frequencies and disease association”, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Vol.33 (5), p. 864-874
  24. Threadgold, T., Greenwood, E.C., Van Wettere, W. (2021) “Identifying Suitable Supplements to Improve Piglet Survival during Farrowing and Lactation”, *Animals*, 11, 2912. [https://doi.org/ 10.3390/ani1110291](https://doi.org/10.3390/ani1110291)
  25. Vanderhaege C, Dewulf J, de Kruif A, Maes D. (2013) “Non-infectious factors associated with stillbirth in pigs: A review”, *Animal Reproduction Science* 139, p. 76–88
  26. Yoon HA1, Eo SK, Aleyas AG, Park SO, Lee JH, Chae JS, Cho JG, Song HJ. (2005) “Molecular survey of latent pseudorabies virus infection in nervous tissues of slaughtered pigs by nested and real-time PCR.” *J Microbiol.*, 43 (5):430-6