

# LA MUTAZIONE RESPONSABILE DELLA SINDROME DA STRESS DEL SUINO

PETER JAMES O'BRIEN, DVM, PhD, DVSc

Department of Pathology, Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario

La sindrome da stress del suino (PSS o *Porcine Stress Syndrome*) si sviluppa in animali geneticamente predisposti (Fig. 1) sottoposti a fattori stressanti da sforzo,<sup>1,2</sup> termici<sup>1,3</sup> e sociali<sup>1,2</sup> oppure in risposta alla stimolazione farmacologica<sup>4-6</sup> della muscolatura scheletrica<sup>7,8</sup> (Fig. 2). La sindrome è dovuta ad inappropriate ed eccessive risposte metaboliche e contrattili del muscolo alla stimolazione.<sup>7,8</sup> Se insorge durante l'anestesia (soprattutto ottenuta con alotano<sup>5,6</sup> e succinilcolina cloridrato<sup>4</sup>), la sindrome viene indicata con il nome di ipertermia maligna,<sup>9</sup> descritta per la prima volta in pazienti umani predisposti geneticamente<sup>10</sup> e ben nota nel cane<sup>11</sup> e nel cavallo.<sup>12</sup>

## Fisiopatologia

Nei suini colpiti dalla PSS si ha caratteristicamente lo sviluppo di rigidità muscolare estensoria, ipertermia, dispnea e comparsa di chiazze purpuree sulla cute.<sup>1,13</sup> L'elevatissimo metabolismo muscolare consuma ossigeno e libera calore, potassio, acidi e proteine che passano nel sangue. La marcata risposta fisiologica allo stress associata a questa situazione e, soprattutto, l'ipercatecolaminemia determinano un arresto cardiaco<sup>8</sup> (Fig. 3). I riscontri

necroscopici sono aspecifici e comprendono masse muscolari pallide, flaccide ed essudative (PSE, *pale, soft and exudative*) con odore acido ed aspetto di carne di pollo o di pesce, fibre muscolari ipercontratte, congestione ed edema dei visceri e rapido sviluppo del rigor mortis<sup>2,14</sup> (Fig. 4).

Il primo metodo utilizzato per l'identificazione della sensibilità alla PSS è stato il test di stimolazione con alotano<sup>15,16</sup> (Fig. 5). In questa prova, i suinetti di due o tre mesi venivano immobilizzati e costretti ad inalare per diversi minuti una miscela al 3-5% di alotano in ossigeno attraverso una maschera facciale. Gli animali che sviluppavano una rigidità muscolare estensoria durante il test erano considerati predisposti alla PSS.

Il test era caratterizzato da un'elevata sensibilità per l'identificazione degli omozigoti, ma individuava meno del 25% degli eterozigoti portatori di questa mutazione.<sup>17</sup> Altri eterozigoti venivano riconosciuti se, al posto dell'alotano, si utilizzava la succinilcolina cloridrato.<sup>18,19</sup> La sensibilità all'alotano durante la prova era maggiore se gli animali venivano preventivamente sottoposti a stress da sforzo<sup>20</sup> e termici<sup>17</sup> o trattati con caffeina,<sup>21</sup> mentre veniva attenuata dalla preventiva somministrazione di tranquillanti.<sup>22,23</sup> La sindrome può essere efficacemente trattata con il dantrolene sodico<sup>24</sup> o con il suo analogo, l'azumolene,<sup>25</sup> in

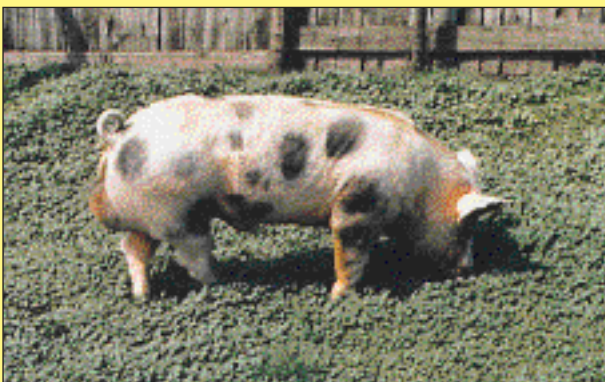


FIGURA 1 - Tipico aspetto di un verro Piétrain omozigote per la mutazione responsabile della sindrome da stress del suino (PSS). L'esemplare mostra un'abbondante massa muscolare e si presenta magro. Le macchie nere di dimensioni variabili sparse fra i peli rossi sono caratteristiche. (Per cortese concessione di Bill E. Remple, PhD, Department of Animal Science, University of Minnesota)



FIGURA 2 - Un incrocio di Landrace che mostra i primi segni della PSS al macello in risposta agli stress da sforzo e sociali derivanti dall'unione con animali di altri gruppi e dal trasporto. Le manifestazioni caratteristiche (descritte per la prima volta nel 1948<sup>8</sup>) sono rappresentate da respirazione a bocca aperta e difficoltosa, aumento della temperatura, spasmi muscolari, lieve cianosi e letargia. (Per cortese concessione di Ted G. Clark, DVM, Department of Pathology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan)



**FIGURA 3** - Mortalità imputabile alla PSS dopo lo scarico di un gruppo di suini trasportati su un camion fino ai recinti del macello. La sindrome viene scatenata in modo particolare dai trasporti effettuati in condizioni di clima caldo-umido e per lunghe distanze. (Per cortese concessione di Ted G. Clark, DVM, Department of Pathology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan)



**FIGURA 4** - Degenerazione muscolare associata alla PSS. Chiazze rosee o purpuree della cute e degenerazione del muscolo longissimus dorsi (PSE) dopo la morte. Le chiazze sono dovute all'imponente rilascio di catecolamine che si verifica durante la sindrome da stress. L'ipermetabolismo porta alla denaturazione delle proteine ed all'afflusso di liquidi all'interno del muscolo. La condizione, in origine chiamata degenerazione muscolare, rende i muscoli lucenti e flaccidi.

associazione con la terapia sintomatica<sup>26</sup> dell'acidosi, dell'iperkalemia, dell'ipossia e dell'ipertermia.

I campioni di muscolo scheletrico isolati dai suini con predisposizione alla PSS risultano ipersensibili alla stimolazione farmacologica,<sup>27,28</sup> neurologica,<sup>29</sup> anossica<sup>30</sup> e fisica.<sup>31</sup> Questa anomalità costituisce la base dei test di contrattura in risposta alla somministrazione di caffeina<sup>27</sup> ed alotano<sup>28</sup> eseguiti su campioni biotipici di muscolo ed universalmente utilizzati per diagnosticare la sensibilità all'ipertermia maligna nell'uomo<sup>32,93</sup> (Fig. 6). Le curve di risposta in funzione della dose per le contratture farmacoindotte sono spostate verso sinistra per l'incremento della sensibilità muscolare dei pazienti umani,<sup>27,28,32,33</sup> dei suini,<sup>34</sup> dei cani<sup>11</sup> e dei cavalli<sup>35</sup> sensibili all'ipertermia maligna.

Per capire la patogenesi della PSS è necessaria una certa comprensione del ruolo del calcio ionizzato intracellulare ( $Ca^{2+}$ ) nella regolazione dell'attività della muscolatura scheletrica.<sup>36</sup> Nel muscolo rilassato, la concentrazione intracellulare del  $Ca^{2+}$  è approssimativamente 10.000 volte più bassa di quella del liquido extracellulare. La contrattilità muscolare e le attività metaboliche vengono attivate da un aumento di 10 volte delle concentrazioni di  $Ca^{2+}$  dovuto al passaggio di questo ione attraverso gli specifici canali del reticolo sarcoplasmatico (l'organulo muscolare in cui



**FIGURA 5** - Reazione di un suino Piétrain alla stimolazione con alotano, effettuata mediante esposizione per 3 minuti ad una miscela al 3% di alotano in ossigeno ad una velocità di flusso di 10 l/min. L'animale mostra una rigidità dei muscoli estensori che blocca gli arti all'infuori in modo che formino un angolo retto con il corpo. In un animale che non reagisce, gli arti sono rilassati e tenuti uno sull'altro. In quelli che rispondono positivamente, la muscolatura risulta dura al tatto e non cede alla pressione digitale; gli arti risultano difficili da piegare. La cute presenta chiazze rosee o purpuree. (Per cortese concessione di Bill E. Remple, PhD, Department of Animal Science, University of Minnesota)

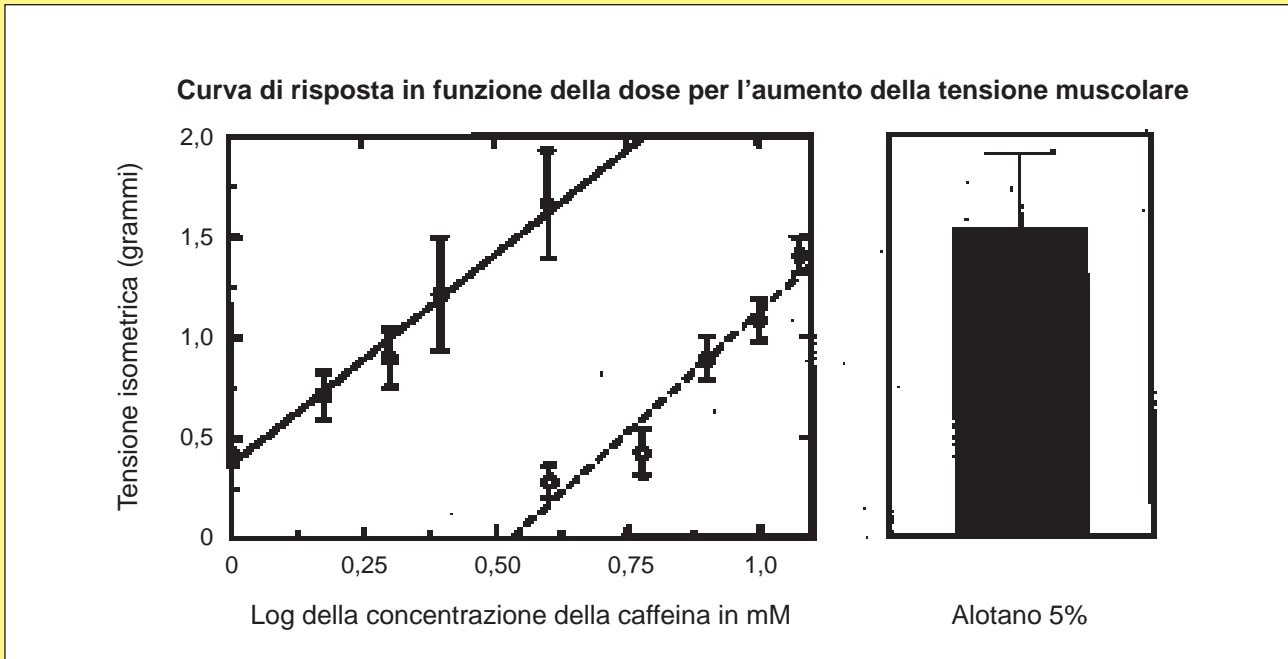


FIGURA 6 - Test di determinazione della predisposizione alla PSS mediante somministrazione di caffeina ed alotano. Viene riportata la curva di risposta in funzione della dose per l'aumento, indotto dalla caffeina, della tensione isometrica dei campioni biotici di muscolo prelevati da suini Yorkshire normali (linea tratteggiata con cerchi bianchi) e suini Piétrain (linea continua con cerchi neri) omozigoti per la mutazione della PSS. Il grafico a barre a destra della figura indica la quantità di sviluppo della tensione nei muscoli di suini Piétrain dopo esposizione ad alotano al 5%, che non determina alcuno sviluppo di tensione nel muscolo dei suini Yorkshire. (mM = millimoli per litro) (Riprodotta con autorizzazione da O'Brien PJ, Kalow BI, Ali N, et al.: Compensatory increase in calcium extrusion activity of untreated lymphocytes from swine susceptible to malignant hyperthermia. JAVMA 51:1038-1043, 1990.)

viene immagazzinato il  $Ca^{2+}$ ). Il rilassamento si ha quando questa quota di  $Ca^{2+}$  liberato viene nuovamente sequestrata nel reticolo sarcoplasmatico da una pompa del  $Ca^{2+}$  ad adenosintrifosfato (ATP).

I canali di passaggio del  $Ca^{2+}$  sono rappresentati da una grande proteina complessa con un peso molecolare di 564.743 Dalton.<sup>37</sup> I suoi principali attivatori fisiologici sono il  $Ca^{2+}$  intracellulare, il fosfato, i nucleotidi dell'adenina (soprattutto l'ATP), la calsequestrina (una proteina in cui viene immagazzinato il  $Ca^{2+}$  nel reticolo sarcoplasmatico) ed un sensore di voltaggio<sup>38</sup> che rileva la depolarizzazione di membrana causata dal potenziale d'azione. Questo sensore (recettore diidropiridinico) è fisicamente connesso al canale del calcio e si riscontra nel tubulo trasversale, un invaginamento della membrana cellulare superficiale che penetra all'interno della cellula.

L'attività dei canali del calcio viene accentuata dalla fosforilazione e dall'ossidazione sulfidrilica.<sup>37</sup> I principali inibitori fisiologici sono il magnesio ( $Mg^{2+}$ ), la calmodulina ed il sensore di voltaggio della membrana superficiale quando rileva la ripolarizzazione.<sup>38,39</sup> Gli agenti farmacologici che aumentano l'attività dei canali del calcio sono l'alotano, la rianodina a concentrazioni nanomolari e la caffeina; invece, l'attività dei canali del calcio viene inibita dal dantrolene sodico, dalla procaina, dal rosso rutenio, dalla spermina e dalla rianodina a concentrazioni micromolari.<sup>37</sup>

È stato possibile determinare la base molecolare della PSS. L'ipersensibilità allo stress dei suini PSS-sensibili<sup>1</sup> è causata dall'ipersensibilità della muscolatura scheletrica agli stimoli<sup>34</sup> (Fig. 6) che, a sua volta, è dovuta all'ipersensibilità dei canali del calcio<sup>7,8,40-45</sup> agli attivatori biochimici (Fig. 7). Come le curve di risposta in funzione della dose

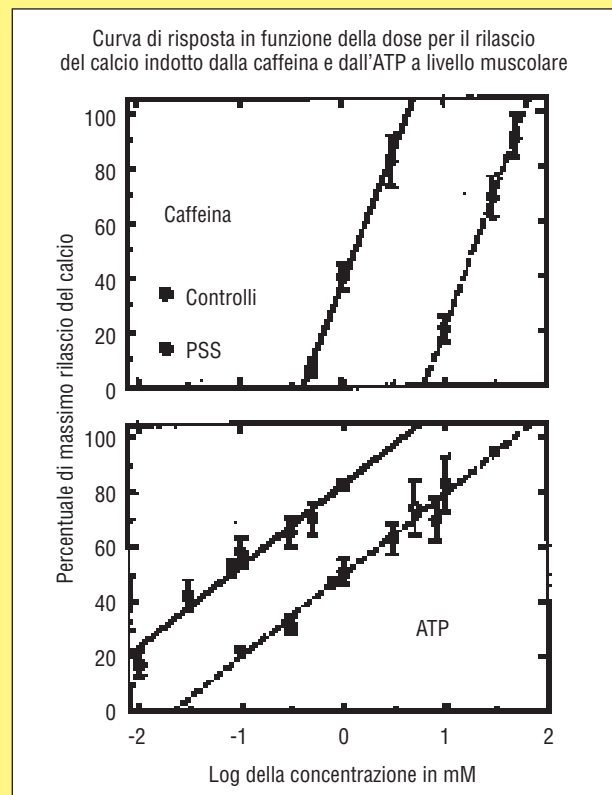


FIGURA 7 - Test per l'ipersensibilità dei canali del calcio. Viene riportata la curva di risposta in funzione della dose per l'aumento, indotto dalla caffeina (grafico in alto) e dall'ATP (grafico in basso), del rilascio di  $Ca^{2+}$  dai canali del calcio del reticolo sarcoplasmatico isolato dalla muscolatura scheletrica di suini Yorkshire normali (linea tratteggiata con cerchi bianchi) e suini Piétrain (linea continua con cerchi neri) omozigoti per la mutazione responsabile della PSS. (mM = millimoli per litro)

relative alla contrattura muscolare indotta da un attivatore,<sup>46</sup> anche le curve di risposta in funzione della dose relative all'apertura dei canali del calcio indotta da un attivatore<sup>42</sup> sono spostate a sinistra a causa della maggiore sensibilità nei suini sensibili alla PSS (Figg. 6 e 7). Poiché la mutazione responsabile della sindrome rende più facile l'apertura e più difficile la chiusura dei canali del calcio, la muscolatura scheletrica risulta più facile da attivare e più difficile da rilassare; le sindromi ipermetaboliche sono quindi più facili da indurre e più difficili da inibire.

La mutazione puntiforme che provoca l'ipersensibilità dei canali del calcio si ha a livello del 1843° dei 15.105 nucleotidi che costituiscono il relativo gene (*ryr-1*) sul cromosoma 6 nella regione p11-q21.<sup>47,48</sup> In questo nucleotide, una base pirimidinica (la citosina) viene mutata in timina; di conseguenza, l'arginina a livello del 615° dei 5035 aminoacidi che compongono la proteina dei canali del calcio viene sostituita dalla cisteina.

## Origine, trasmissione ereditaria e distribuzione

I segni della comparsa della mutazione della PSS possono essere rintracciati in letteratura fin dall'inizio del XX secolo in Germania.<sup>49,50</sup> Già nel 1914 era stato descritto il riscontro di suini dalle carni pallide ed acquose, inadatte all'industria salumiera tedesca.<sup>51</sup> Fra gli anni Venti e gli anni Trenta di questo secolo, sempre in Germania, è stata descritta nei suini una condizione caratterizzata da insufficienza cardiaca acuta, degenerazione della muscolatura scheletrica e carni di colore grigio pallido e di aspetto acquoso.<sup>49,50</sup> Si ritenne che la sindrome fosse associata all'accoppiamento in consanguineità ed agli stress dell'allevamento e del trasporto.

La mutazione responsabile della PSS, apparentemente, si era propagata fra i suini Piétrain<sup>47,48,52</sup> (Fig. 1). Questa razza comparve nella comunità di Piétrain nella provincia belga di Brabant intorno al 1920.<sup>52</sup> La razza probabilmente nacque come conseguenza della mutazione della PSS; l'eccezionale effetto di questo carattere sullo sviluppo delle masse muscolari venne rilevato dagli allevatori ed intensamente selezionato.<sup>52</sup> La razza venne ufficialmente riconosciuta intorno al 1950.<sup>52</sup>

Nel 1948, nella Landrace Danese venne utilizzato il termine *degenerazione muscolare* per indicare la condizione dei suini morti per PSS in associazione con stress da sforzo, termici e sociali e con la formazione di masse muscolari PSE.<sup>2</sup> A partire dalla fine degli anni Cinquanta, i suini di razza Piétrain, i ceppi belgi e tedeschi della Landrace e (negli Stati Uniti) la Poland China divennero ben noti come animali colpiti da PSS, carni PSE e notevole sviluppo muscolare.<sup>14,53</sup> Gli studi condotti sui suini Piétrain e Poland China nella metà degli anni Sessanta indicarono un'associazione fra una sensibilità ereditaria allo stress e le esagerate risposte fisiologiche agli stress termici e da sforzo e lo sviluppo della condizione nota come PSE.<sup>54,55</sup> Il termine di *porcine stress syndrome* venne coniato nel 1968.<sup>1</sup> Alla fine degli anni Sessanta, nella razza Landrace Inglese<sup>4</sup> e Sudafricana<sup>5</sup> venne segnalata l'ipertermia maligna indotta dall'anestesia, che ben presto venne attribuita allo stesso difetto responsabile della PSS.<sup>9,56</sup>

Con lo sviluppo del test di stimolazione con alotano nel

1974, divenne possibile individuare la mutazione responsabile della PSS. Nella maggior parte delle nazioni, i suini delle razze Hampshire, Duroc, Large White e Yorkshire rispondevano solo raramente all'alotano; invece, i soggetti di razza Piétrain, Landrace e Poland China reagivano frequentemente. Negli anni Settanta, le percentuali e le localizzazioni geografiche dei suini Landrace che reagivano all'alotano suggerirono che la mutazione si fosse diffusa dal Belgio e dalla Germania: 85% in Belgio, 68% in Germania, 22% nei Paesi Bassi, 18% in Francia, 14% in Svizzera, 15% in Svezia, 14% in Sud Africa, 11% in Gran Bretagna, 7% in Danimarca e 5% in Norvegia, Irlanda ed Australia.<sup>13,15,53,56-60</sup> Dalle razze Piétrain, Poland China e (soprattutto) Landrace, la mutazione PSS si era diffusa nel giro di qualche decennio praticamente a tutte le altre razze domestiche utilizzate per la produzione intensiva di carne in tutto il mondo.<sup>61</sup>

La PSS si trasmette ereditariamente attraverso un unico gene autosomico,<sup>62-66</sup> la cui dominanza dipende però dal carattere che viene considerato. Questa modalità riflette la dose di gene PSS necessaria ad esibire il carattere e l'espressione del gene PSS che viene modificata dai fattori fenotipici, ambientali, gestionali e farmacologici.

L'ereditarietà è recessiva a penetranza elevata, ma incompleta, ed espressività variabile per una reazione positiva al test di stimolazione con alotano<sup>62-66</sup> e per la sensibilità alla PSS.<sup>54-56</sup> La trasmissione ereditaria è codominante con l'allele normale che condiziona le caratteristiche di resa delle carcasse e degli animali vivi<sup>67</sup> e l'esito del test di contrattura in risposta alla caffeina ed all'alotano,<sup>47,68</sup> del test al DNA<sup>47</sup> e dei test biochimici per l'identificazione del difetto.<sup>42</sup> Di conseguenza, i risultati di questi test e delle misurazioni di queste caratteristiche nei suini eterozigoti per la mutazione responsabile della PSS sono approssimativamente a metà fra quelli dei suini normali e quelli dei soggetti omozigoti per la stessa mutazione.

Anche se l'analisi aplo-tipica del gene *ryr-1* indica che la mutazione della PSS deriva da un unico animale capostipite,<sup>47</sup> il gene mutato è presente in più del 25% degli allevamenti suini del Nord America e dell'Europa.<sup>61</sup> La rapida ed estesa diffusione della mutazione nell'industria suinicola mondiale nel corso degli ultimi decenni è stata dovuta a diversi fattori. In primo luogo, le caratteristiche genetiche dei suini allevati per la macellazione dipendono da un numero di riproduttori relativamente limitato. Di conseguenza, l'occorrenza di un carattere favorevole può aumentare rapidamente. In secondo luogo, nei programmi di miglioramento genetico è comune l'introduzione di nuovi riproduttori.

Infine, la mutazione PSS influisce favorevolmente sullo sviluppo muscolare, sulla magrezza della carne e sulla distribuzione dei grassi nelle carcasse, tutti parametri ampiamente usati come criteri di selezione nei programmi di miglioramento genetico. Inoltre, gli allevatori che producono suini con le deleterie caratteristiche della mutazione PSS (ad esempio, masse muscolari PSE) sono stati scarsamente penalizzati.

All'inizio degli anni Novanta, la mutazione PSS è stata identificata nella maggior parte delle moderne razze domestiche di suini, ad esempio nel 97% della Piétrain, nell'80% della Poland China, nel 37% della Landrace, nel 22% della Large White, della Duroc e della Hampshire e

nel 17% della Yorkshire<sup>69</sup> (Tab. 1). La mutazione è stata anche identificata nelle razze Berkshire e Chester White. La prevalenza della condizione era maggiore nel Regno Unito che nel Nord America e più elevata negli Stati Uniti che nel Canada.

Su 25.074 suini esaminati, il 24,3% era eterozigote ed il 2,0% era omozigote per la mutazione responsabile della PSS. In base a questi dati, la frequenza (p) del gene PSS era stata calcolata pari a 0,142 dal numero di suini eterozigoti, più due volte il numero di suini omozigoti, diviso per il doppio del numero dei suini esaminati. Di conseguenza, la frequenza del gene normale (q) è di 0,858 (cioè 1-0,142).

Presumendo che sia valida la genetica mendeliana e che i suini con la mutazione PSS si accoppino secondo il criterio della casualità, le frequenze del gene responsabile della sindrome permettono di prevedere accuratamente la percentuale di suini omozigoti per il gene PSS ( $p^2$ ) e di quelli eterozigoti ( $2pq$ ). Per tutti i suini esaminati, le frequenze previste erano simili a quelle osservate: 2,0% per gli omo-

zigoti e 24,4% per gli eterozigoti per il gene PSS. Per i suini di razza pura di tutte le nazioni, tuttavia, la percentuale prevista di omozigoti arrivava al doppio di quella riscontrata. Ciò probabilmente è dovuto al fatto che gli omozigoti si possono distinguere senza ricorrere a test a DNA e che l'impiego di questi animali a scopi riproduttivi viene contrastato. Per gli incroci degli Stati Uniti, invece, la percentuale prevista di omozigoti era inferiore di un terzo a quella riscontrata, il che suggerisce che l'impiego di questi animali per la riproduzione venga favorito.

## Identificazione mediante test a DNA

Prima dello sviluppo del test a DNA per l'identificazione della mutazione della PSS in Europa, la trasmissione ereditaria della predisposizione alla sindrome era stata in gran parte rintracciata attraverso le linee familiari mediante l'analisi aplo-tipica dei loci marcatori correlati in associazione con il test di stimolazione con alotano.<sup>70,71</sup> Il locus

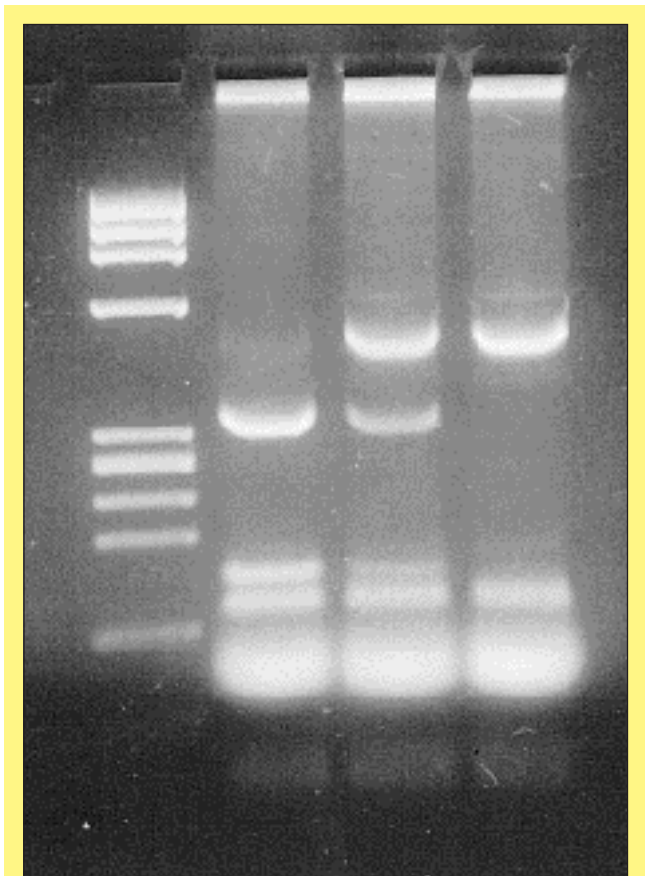
**Tabella 1**  
Prevalenza della mutazione della sindrome da stress del suino in Canada, Stati Uniti ed Inghilterra

Razza	Nazione	Numero di test	Numero di normali	Numero di eterozigoti <sup>a</sup>	Numero di omozigoti <sup>a</sup>	Percentuale di normali	Percentuale di eterozigoti <sup>a</sup>	Percentuale di omozigoti <sup>a</sup>	Frequenza del gene della PSS
Piétrain	Canada	6	0	3	3	0	50,0	50,0	0,750
	USA	66	2	35	29	3,0	53,0	43,9	0,705
	<i>Totale</i>	72	2	38	32	2,8	52,8	44,4	0,708
Poland China	USA	30	6	18	6	20,0	60,0	20,0	0,500
Landrace	Canada	2885	1947	852	86	67,5	29,5	3,0	0,177
	USA	1519	918	579	22	60,4	38,1	1,5	0,205
	Inghilterra	1954	1143	747	64	58,5	38,2	3,3	0,224
	<i>Totale</i>	6358	4008	2178	172	63,0	34,3	2,7	0,198
Duroc	Canada	1100	935	163	2	85,0	14,8	0,2	0,076
	USA	682	441	236	5	64,7	34,6	0,7	0,180
	Inghilterra	98	97	1	0	99,0	1,0	0	0,005
	<i>Totale</i>	1880	1473	400	7	78,4	21,3	0,4	0,110
Large White	Canada	606	502	103	1	82,8	17,0	0,2	0,087
	USA	183	141	40	2	77,0	21,9	1,1	0,120
	Inghilterra	1850	1432	410	8	77,4	22,2	0,4	0,115
	<i>Totale</i>	2639	2075	553	11	78,6	21,0	0,4	0,109
Hampshire	Canada	643	519	122	2	80,7	19,0	0,3	0,098
	USA	385	278	104	3	72,2	27,0	0,8	0,143
	Inghilterra	7	6	1	0	85,7	14,3	0	0,071
	<i>Totale</i>	1035	803	227	5	77,6	21,9	0,5	0,114
Yorkshire	Canada	3341	2726	604	11	81,6	18,1	0,3	0,094
	USA	401	380	21	0	94,8	5,2	0	0,026
	<i>Totale</i>	3742	3106	625	11	83,0	16,7	0,3	0,086
Chester White	USA	23	23	0	0	100,0	0	0	0
Berkshire	USA	5	2	3	0	40,0	60,0	0	0,300
Incroci	Canada	581	468	106	7	80,6	18,2	1,2	0,103
	USA	8560	6401	1916	243	74,8	22,4	2,8	0,140
	Inghilterra	177	126	49	2	71,2	27,7	1,1	0,150
	<i>Totale</i>	9318	6995	2071	252	75,1	22,2	2,7	0,138
Tutte le razze	Canada	9162	7097	1953	112	77,5	21,3	1,2	0,119
	USA	11.854	8592	2952	310	72,5	24,9	2,6	0,151
	Inghilterra	4086	2804	1208	74	68,6	29,6	1,8	0,166
	<i>Totale</i>	25.102	18.493	6113	496	73,7	24,3	2,0	0,142

<sup>a</sup>Gene della PSS

per l'ipersensibilità all'alotano è stato indicato col nome di gene Hal<sup>72</sup> e si è dimostrato strettamente correlato ai geni per il gruppo sanguigno H (H),<sup>73</sup> sopprimendo l'effetto su gruppi sanguigni A-O (S),<sup>74</sup> fosfoesoisomerasi eritrocitaria (Phi)<sup>75</sup> e 6-fosfogluconato deidrogenasi (6-Pgd)<sup>75</sup> e postalbumina-2 sierica (PO-2),<sup>76</sup> che sono vicini al centro del cromosoma 6.<sup>77,78</sup> Questa regione è omologa a quella del ramo lungo del cromosoma 19 dell'uomo.<sup>79</sup>

La conoscenza del sito di mutazione della PSS ha portato allo sviluppo di un test a DNA per la sua identificazione<sup>47,80,61</sup> (Fig. 8). Con questo metodo, si isola il DNA dal sangue, dal muscolo, dallo sperma o da altri tessuti del soggetto da esaminare<sup>61</sup> (Figg. 9 e 10). Il numero di copie di DNA nella regione immediatamente circostante al sito di mutazione viene aumentato di circa un milione di volte attraverso la reazione a catena della polimerasi (PCR). Il DNA amplificato viene quindi sottoposto all'analisi del polimorfismo di lunghezza di frammenti di restrizione (RFLP o *restriction fragment length polymorphism*), nella quale viene incubato con un enzima endonucleasi di restrizione che scinde il DNA in due punti.



**FIGURA 8** - Prodotto finale del test a DNA per l'identificazione della PSS: il quadro elettroforetico del DNA trattato con un'endonucleasi di restrizione che scinde il DNA in corrispondenza di (1) un punto comune al DNA normale ed a quello mutato e (2) il sito di mutazione responsabile della PSS. La diagnosi viene formulata in base a numero, posizione ed intensità della colorazione dei frammenti di DNA. Si distinguono quattro bande contenenti il DNA (numerata da sinistra a destra); il materiale genetico procede dall'alto verso il basso della pagina. Banda 1 = frammenti di DNA di dimensioni note utilizzati per confronto. Banda 2 = DNA di un suino omozigote (dimutante) per la mutazione PSS (Hal-1843 dm). Banda 3 = DNA di un suino eterozigote per la mutazione PSS (Hal-1843 mm). Banda 4 = DNA di un suino normale (non mutante) (Hal-1843 nm).

Il primo punto di scissione è comune al DNA normale e a quello mutato, mentre il secondo è localizzato in coincidenza della sede di mutazione. Il numero e le dimensioni dei frammenti di DNA così ottenuti vengono determinati mediante elettroforesi in gel di agarosio e con una colorazione per il DNA. Le modalità di colorazione permettono di identificare senza incertezze il genotipo della PSS (Fig. 8).

Nel Canada e negli Stati Uniti è stato rilasciato un brevetto per l'identificazione della mutazione della PSS ed è stato registrato un marchio depositato (*trademark*) per la classificazione del genotipo PSS degli animali colpiti o della loro progenie.<sup>48</sup> Il marchio depositato è basato sul nome del locus genico della mutazione della PSS (Hal), sul numero di nucleotide che identifica la sede della mutazione a punto singolo (1843) e sull'aggiunta di alcune lettere che indicano se l'animale non è colpito dalla mutazione (Hal-1843 nm [non mutante]), eterozigote per la mutazione (Hal-1843 mm [monomutante]) od omozigote per la mutazione (Hal-1843 dm [dimutante]). Per ogni suino esaminato, viene rilasciato un certificato sul quale sono riportati l'identificazione del capo, il nome del proprietario, il genotipo Hal-1843 e l'autorizzazione.

Gli allevatori di suini possono ottenere delle licenze per far sottoporre i loro animali alla determinazione del genotipo a livello del locus Hal 1843 ed utilizzare il relativo marchio depositato. Il costo comprende, oltre alle spese di esecuzione del test, il pagamento dei diritti di brevetto. Gli allevatori di suini devono pagare una specifica quota aggiuntiva relativa ai diritti per il test della PSS, a seconda che abbiano o meno ottenuto la licenza ed in relazione al numero di suini da esaminare.

Il test per la PSS basato sull'identificazione della mutazione Hal-1843 viene eseguito routinariamente su campioni di 1-2 ml di sangue fresco intero posti in provette contenenti acido etilendiaminotetracetico (EDTA) ed inviati immediatamente al laboratorio per l'esecuzione dell'esame. Più recentemente, è stato sviluppato un metodo meno costoso di prelievo, stoccaggio e trasporto del sangue. Servendosi di una piccola lancetta, si prelevano da una vena auricolare alcune gocce di sangue, lasciate cadere su un pezzo di carta da filtro. Le gocce vengono quindi lasciate asciugare all'aria, impilate, conservate a tempo indefinito ed inviate per posta al laboratorio nel momento ritenuto più opportuno. L'essiccazione dei campioni di sangue fresco su un foglio di carta da filtro preserva il DNA. Il test per la PSS è stato anche utilizzato per determinare il genotipo dello sperma di suini morti o dai quali non era facilmente ricavabile dai campioni di sangue.

Oltre ad essere utilizzato nei programmi di selezione genetica, il test per l'identificazione della PSS può essere effettuato su campioni necroscopici di muscolo o grasso. Questi materiali possono essere utilizzati dagli operatori dell'industria del suino o dai ricercatori per valutare il contributo genetico alla cattiva qualità delle carcasse ottenute. Per confermare una diagnosi di predisposizione alla PSS, il test può essere eseguito anche sui soggetti colpiti da morte improvvisa o trovati morti.

L'accuratezza del test è limitata dall'errore umano (soprattutto nella trascrizione e nel trasferimento delle informazioni) a livello del laboratorio e, più frequentemente, durante il prelievo del sangue e l'invio all'analisi.<sup>61</sup>

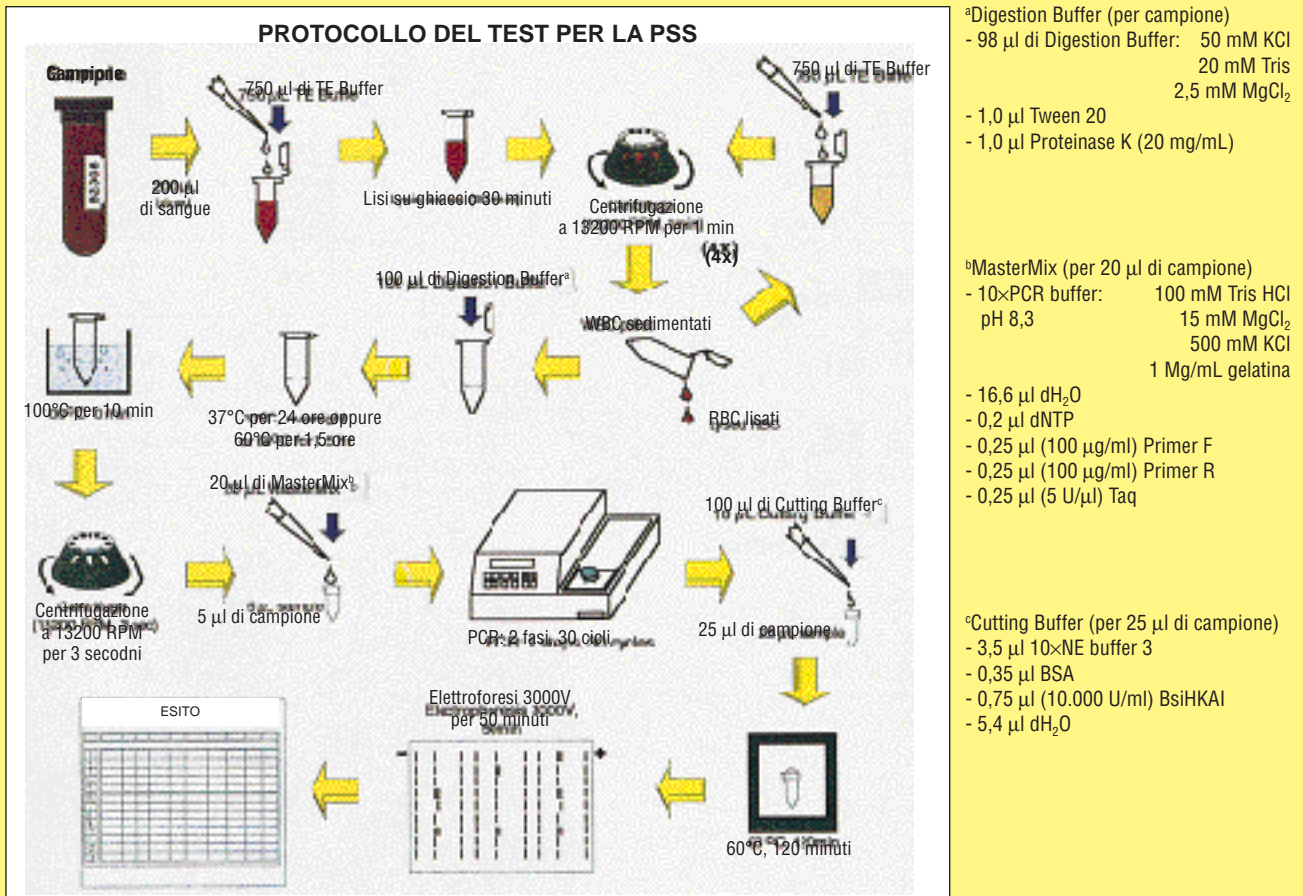


FIGURA 9 - Protocollo per il test per la diagnosi della PSS. Lo schema illustra e riassume la prova. La carta da filtro contenente alcune gocce di sangue viene trattata in maniera analoga. (TE = 10 mM di Tris ed 1 mM di EDTA; WBC = leucociti; RBC = eritrociti; PCR = reazione a catena della polimerasi; KCl = cloruro di potassio; mM = millimoli per litro; Tris = trisidrossiaminometano; MgCl<sub>2</sub> = Cloruro di magnesio; ml = millilitri; Mg = magnesio; dH<sub>2</sub>O = acqua deionizzata, dNTP = dinucleotide trifosfato; Taq = Taq DNA-polimerasi; NE = 10 x NE tampone 3; BSA = albumina sierica bovina; BsiHKAI = endonucleasi di restrizione BsiHKAI).

Si verificano anche degli errori in azienda, nell'attribuzione dei singoli genitori o nell'identificazione di un individuo, oppure nell'etichettatura dei campioni. L'adozione di rigorosi programmi di controllo qualità con doppi e tripli controlli può ridurre gli errori ed aumentare l'accuratezza fino ad oltre il 99%.<sup>61</sup> Ciò nonostante, per una maggiore certezza diagnostica si suggerisce di ripetere il test o raddoppiare i campioni da esaminare.

### Caratteri associati

Oltre a quelli, positivi, sullo sviluppo muscolare e sulla magrezza della carne, la mutazione della PSS determina anche degli effetti deleteri. La mortalità dovuta alla sindrome da stress è quello più grave e drammatico, ma colpisce principalmente i suini omozigoti, che sono meno comuni degli eterozigoti. In condizioni di stress limitato, la PSS interessa una ridotta percentuale di omozigoti.<sup>81</sup> La sindrome da stress del suino si osserva quindi con una frequenza che risulta inferiore di uno o due ordini di grandezza rispetto alla mutazione che ne è la causa.

Anche se la mortalità da PSS può essere poco comune, l'industria del suino subisce dei mancati guadagni a causa della formazione di carni PSE. Queste sono dovute ad una glicolisi postmortale determinata dall'anossia e dalla sti-

molazione nervosa e meccanica che si ha al momento della macellazione.<sup>82</sup> La conseguente produzione di acido lattico e calore determina la denaturazione delle proteine sarcoplasmatiche ed il deterioramento della capacità di legare l'acqua. L'aumento dell'attività osmotica dovuto ai prodotti terminali dell'ipermetabolismo causa un afflusso di acqua dagli spazi extracellulari, causando un'emoconcentrazione ed un aumento del contenuto idrico all'interno delle fibre muscolari.<sup>83,84</sup> Il muscolo diviene pallido, flaccido, essudativo (acquoso), con un odore acido ed una struttura lassa.<sup>14</sup>

Poiché i muscoli colpiti dalla mutazione PSS sono ipersensibili alla stimolazione, la formazione postmortale delle carni PSE è più frequente e grave che nel muscolo normale. I mancati redditi correlati alla condizione di PSE sono causati dalla perdita di acqua durante la conservazione, il trasporto e la lavorazione delle carcasse, che si traduce in un aumento del calo del peso e, quindi, del valore economico.<sup>85,86</sup> Anche la riduzione della durata commerciale<sup>86</sup> e dell'accettabilità organolettica<sup>87,88</sup> causano una perdita economica. Inoltre, i suini colpiti da gravi forme di PSE devono essere destinati ad ulteriori lavorazioni, per trasformarli in prodotti di minore valore.

È noto che la PSE si osserva nei suini colpiti dalla PSS, ma la si riscontra anche in animali che non presentano questa mutazione. Il riscontro di carni suine pallide, flacci-

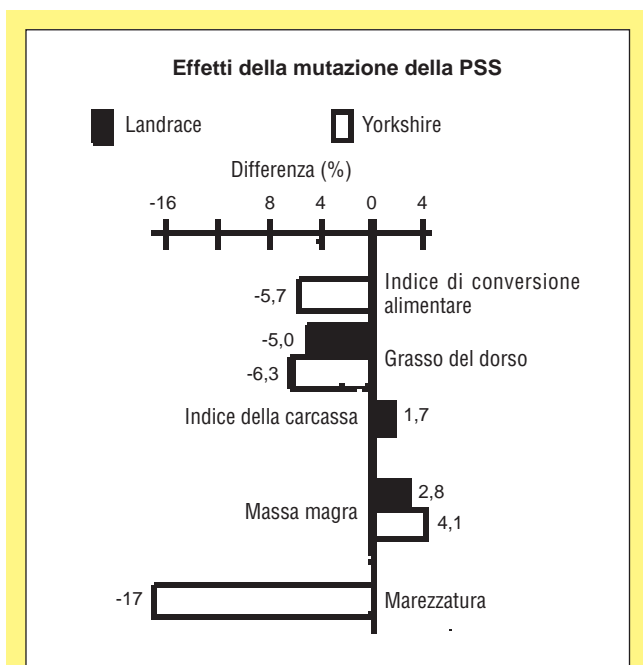


FIGURA 10 - Effetti della mutazione della PSS sulle caratteristiche della resa delle carcasse e degli animali vivi in suini Landrace e Yorkshire. Le differenze percentuali fra i suini mutanti e quelli non mutanti sono riportate vicino alla corrispondente barra del grafico. L'indice di conversione alimentare era misurato in kg di cibo occorrenti per ottenere un kg di peso vivo. L'indice della carcassa è basato sul peso della carcassa stessa (dopo eviscerazione e rimozione di testa, reni e sugna) misurato mediante sonda elettronica del grasso e della massa magra a livello della decima costola. La marezzatura è una misura soggettiva del grasso intramuscolare del muscolo longissimus dorsi su una scala graduata divisa in cinque punti. Il grasso del dorso era misurato ecograficamente in suini del peso di 100 kg. La massa magra è il peso del tessuto muscolare magro per mezza carcassa.

de ed edematose dall'aspetto simile a quello delle carni di pollo era già stato descritto in letteratura, in Germania, all'inizio del secondo decennio di questo secolo.<sup>49</sup>

Il recente sviluppo del definitivo test a DNA per l'identificazione della mutazione della PSS ha permesso di determinare in modo preciso gli effetti della mutazione stessa sulle caratteristiche della resa delle carcasse e degli animali vivi<sup>67</sup> (Figg. 11 e 12). Questi dati dimostrano che l'espressione della mutazione della PSS è modificata dal fenotipo (cioè dalla razza). Suini Landrace eterozigoti per la PSS sono stati confrontati con suini non mutanti della stessa razza, rilevando un calo del 5% del grasso del dorso; questi animali tendevano a mostrare un aumento dell'indice di carcassa (una stima della massa muscolare e della magrezza) dell'1,7%, della massa magra totale del 2,8% e della massa magra della coscia del 3,8%. L'occorrenza delle forme gravi di PSE era più che raddoppiata.

Suini Yorkshire eterozigoti per PSS sono stati confrontati con animali non mutanti della stessa razza, rilevando un calo della conversione alimentare (kg di alimento necessari a produrre 1 kg di peso vivo) del 5,7%, del grasso del dorso del 6,3% e della marezzatura (grasso intramuscolare) del 17%. Era invece presente un aumento della massa magra totale del 4,1%, della massa magra della coscia del 5,8% e della massa magra della spalla del 3,0%; l'occorrenza delle forme gravi di PSE era più che raddoppiata.

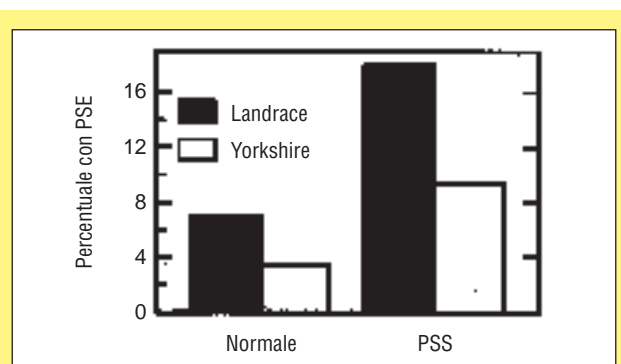


FIGURA 11 - Effetti della mutazione PSS sullo sviluppo delle gravi forme di PSE nella muscolatura dei suini Landrace e Yorkshire. La percentuale di soggetti che presentava gravi quadri di pallore, flaccidità ed essudazione delle carni (PSE) è riportata accanto alla corrispondente barra del grafico. La presenza della PSE nelle carni è stata stimata 24 ore dopo la macellazione utilizzando la scala standard dell'Agricoltura Canadese, graduata da 1 a 5 (3 ottimale, 2 lieve ed 1 grave).



FIGURA 12 - Laboratorio per l'esecuzione dei test per la diagnosi di PSS. Le apparecchiature occorrenti sono rappresentate da microcentrifuga, incubatrice a bagnomaria, pipettatrici manuali ed automatiche, strumenti per l'esecuzione della reazione a catena della polimerasi, strumenti per elettroforesi, transilluminatore, camera oscura e sistema fotografico Polaroid™. Quattro operatori hanno eseguito in questo laboratorio 35.000 test nell'arco di tre anni.

L'effetto della mutazione della PSS sullo sviluppo muscolare e sulla magrezza può essere spiegato in modo plausibile con il suo effetto sui canali del calcio. L'ipersensibilità di questi ultimi facilita l'accoppiamento eccitazione-contrazione nella muscolatura scheletrica. A parità di stimolazione, l'attività contrattile e metabolica del muscolo è più frequente, più intensa e più duratura nei suini portatori della mutazione che in quelli che non lo sono. Poiché l'attività contrattile è uno stimolo all'ipertrofia muscolare ed alla mobilitazione del grasso come substrato per il metabolismo, i suini con PSS sono più muscolosi e magri.

Basandosi sui tessuti che esprimono il gene mutato, è possibile dedurre quali siano quelli, diversi dalla muscolatura scheletrica, che potrebbero essere direttamente influenzati dalla mutazione. I canali del calcio sono codificati da tre geni (*ryr-1*, *ryr-2* e *ryr-3*), caratterizzati da un'espressione specifica nei tessuti.<sup>37</sup> Solo il *ryr-1* viene espresso nella muscolatura scheletrica e nell'encefalo, ed in particolare negli elementi cerebellari del Purkinje.<sup>89</sup> Il gene *ryr-2* viene espresso a livello cardiaco ed endoteliale ed è di gran lunga il principale gene *ryr* espresso nell'encefalo.



Il gene *ryr-3* viene espresso nella muscolatura liscia, nell'epitelio e nell'encefalo. La muscolatura scheletrica ed alcune regioni cerebrali, ma non la muscolatura cardiaca o liscia, sono quindi direttamente influenzate dalla mutazione PSS.<sup>37,89</sup>

L'impatto fisiologico dell'espressione del gene *ryr-1* sull'encefalo è sconosciuto. Gli effetti della mutazione sono quindi imprevedibili. Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale nella sensibilità allo stress è implicato anche dall'osservazione di anomalie regionali delle concentrazioni dei neurotrasmettitori nell'encefalo dei suini PSS-sensibili.<sup>90</sup> Il fatto che il gene mutato sia espresso nel tessuto cerebrale può sostenere questa ipotesi; tuttavia, le modificazioni neurochimiche possono essere secondarie all'ipermetabolismo ed all'ipercontrattilità causate dal difetto muscolare primario.

La distribuzione del tessuto adiposo e delle riserve di grasso muscolari (marezzatura) è probabilmente interessata indirettamente dalla mutazione PSS, ed ha naturalmente delle conseguenze sull'alterazione del metabolismo del muscolo scheletrico. Analogamente, è possibile che le lievi anomalie eritrocitarie<sup>17</sup> e linfocitarie<sup>91</sup> che si verificano nei suini sensibili alla PSS siano secondarie all'alterazione del metabolismo muscolare; tuttavia, non è ancora possibile escludere un effetto diretto della mutazione.

Anche se nel suino l'ipertermia maligna può essere attribuita ad una mutazione verificatasi in un singolo sito, nell'uomo la malattia è causata da mutazioni in molti siti; più di metà si trovano nel gene *ryr-1*.<sup>92-96</sup> Questa differenza di specie riflette l'esteso controllo degli accoppiamenti e dei fattori genetici nei moderni suini domestici, che sono caratterizzati da un alto grado di consanguineità, hanno una bassa eterogeneità genetica e sono stati sottoposti ad un'intensa pressione selettiva a favore della mutazione della PSS.

Nell'uomo, la sensibilità all'ipertermia maligna è da 5.000 a 25.000 volte meno comune che nel suino.<sup>8</sup> Sempre nell'uomo, la condizione può essere causata da mutazioni dei canali del calcio per cui a livello 614 l'arginina viene sostituita dalla cisteina, la glicina-341 dall'arginina e la glicina-248 dall'arginina.<sup>92-94</sup> In un sottogruppo di pazienti umani con sensibilità all'ipertermia maligna, il muscolo può presentare i nuclei centrali delle fibre muscolari privi di mitocondri. Entrambi i disordini sono prodotti da una mutazione dei canali del calcio caratterizzata dalla sostituzione dell'arginina-2434 con istamina, dell'arginina-163 con la cisteina o dell'isoleucina-403 con la metionina.<sup>95,96</sup> Infine, si può avere una mutazione di altri geni che causano l'ipertermia maligna nell'uomo.<sup>97</sup>

## Impiego nei programmi di miglioramento genetico

Nello sviluppo di una strategia ottimale per l'utilizzo della mutazione PSS si devono prendere in considerazione diversi fattori. I suini omozigoti sono troppo esposti al rischio di sviluppo della PSS e delle forme gravi di PSE per essere utili per la commercializzazione; tuttavia, possono essere un'importante fonte di animali portatori della mutazione della PSS. Può essere utile produrre dei suini maschi eterozigoti da avviare alla commercializzazione.

Dato il ristretto margine di profitto dell'industria suinicola, un aumento del 3-4% della massa magra (e quindi delle entrate dei produttori) può accrescere sostanzialmente il profitto.

In questi suini, il rischio di PSS è minimo. La prevalenza e la gravità della PSE che possono sviluppare può essere accettabile se vengono ridotti al minimo i fattori ambientali e gestionali che provocano o aggravano la condizione. Infine, l'uso del test a DNA per l'identificazione della malattia rende possibile controllare con precisione l'occorrenza della mutazione.

In alternativa alla regolazione dell'espressione della mutazione della PSS, si potrebbe cercare di eradicare la malattia dagli allevamenti. La maggior parte dei soggetti impiegati per la riproduzione (73,7%) non presenta la mutazione. Quest'ultima, quindi, non è un requisito indispensabile per ottenere lo sviluppo delle masse muscolari e la magrezza.

Una politica basata sull'identificazione dei capi affetti e sulla loro distruzione potrebbe evitare la perdita di un criterio di selezione facilmente accessibile, prevedibile ed economicamente conveniente per ottenere le caratteristiche di rendimento delle carcasse e degli animali vivi. Inoltre, eradicare la mutazione della PSS senza includere nel programma la qualità dei suini come criterio di selezione potrebbe portare alla selezione accidentale di una mutazione alternativa (come si riscontra nell'uomo) destinata a diventare una causa importante di PSS e PSE. La migliore strategia da adottare è quindi probabilmente molto variabile, a seconda di (1) scopi del produttore, (2) qualità e razza degli animali e modalità con cui la mutazione influisce sulle caratteristiche di resa delle carcasse e degli animali vivi, (3) organizzazione dell'industria suinicola regionale e (4) i fattori ambientali e gestionali prevalenti che predispongono gli animali allo sviluppo della PSE.

## Ringraziamenti

*Questo lavoro è stato finanziato con i fondi del Porcine Stress Syndrome Test Laboratory del Department of Pathology, Ontario Veterinary College, University of Guelph.*

## Bibliografia

1. Topel DC: Porcine stress syndrome. *Mod Vet Pract* 40:59-60, 1968.
2. Ludigsen J: Muscular degeneration in hogs. 15th Int Vet Cong Stockholm 1:602-606, 1953.
3. Ording H, Hald A, Sjøntoft E: Malignant hyperthermia triggered by heating in anesthetized pigs. *Acta Anesthesiol Scand* 29:698-701, 1985.
4. Hall LW, Woolf N, Bradley JWP, Jolly DW: Unusual reaction to suxamethonium chloride. *Br Med J* 4:1305, 1966.
5. Harrison GG, Beibuyck FJF, Terblanche J, et al: Hyperpyrexia during anesthesia. *Br Med J* 3:594-595, 1968.
6. Eikelenboom G, Sybesma W: Several ways of stunning and their influences on meat quality, in Sybesma W, van der Wal PG, Walstra P (eds): *Recent Points of View on the Condition and Meat Quality of Pigs for Slaughter*. Zeist, Holland, Research Institute for Animal Husbandry, 1968, pp 209-212.
7. O'Brien PJ: Etiopathogenetic defect of malignant hyperthermia: Hypersensitive calcium-release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Vet Res Commun* 11:527-559, 1987.
8. O'Brien PJ, Klip A, Britt BA, Kalow BI: Malignant hyperthermia suscep-

- tibility: Biochemical basis for pathogenesis and diagnosis. *Can J Vet Res* 54:83-92, 1990.
9. Sybesma W, Eikelenboom G: Malignant hyperthermia in pigs. *Heath J Vet Sci* 2:155-160, 1969.
  10. Denborough MA, Lovell RRH: Anesthetic deaths in a family. *Lancet* 2:45, 1960.
  11. O'Brien PJ, Cribb PH, White RJ, et al: Canine malignant hyperthermia—Diagnosis of susceptibility in a breeding colony. *Can Vet J* 24:172-177, 1983.
  12. Klein LV: Case report: A hot horse. *Vet Anesth* 2:41-42, 1975.
  13. Mitchell G, Heffron JJA: Porcine stress syndromes. *Adv Food Res* 28:167-230, 1982.
  14. Briskey EJ: Etiological status and associated studies of pale, soft, exudative porcine musculature. *Adv Food Res* 13:89-178, 1964.
  15. Eikelenboom G, Minkema D: Prediction of pale, soft, exudative muscle with a non-lethal test for the halothane-induced porcine malignant hyperthermia syndrome. *Tijdschr Diergeneeskd* 99:421-426, 1974.
  16. Christian LL: Halothane test for PSS—Field application. *Proc AASP*:6-11, 1974.
  17. O'Brien PJ, Rooney MT, Reik TR, et al: Porcine malignant hyperthermia susceptibility: Erythrocyte osmotic fragility. *Am J Vet Res* 46:1451-1456, 1985.
  18. Webb AJ, Imlah P, Carden RE: Succinylcholine and halothane as a field test for the heterozygote at the halothane locus in pigs. *Anim Prod* 42:275-279, 1986.
  19. Seeler DC, McDonnell WN, Basrur PK: Halothane and halothane succinylcholine induced malignant hyperthermia (porcine stress syndrome) in a population of Ontario boars. *Can J Comp Med* 147:284-290, 1984.
  20. Van den Hende C, Lister D, Muylle E, et al: Malignant hyperthermia in Belgian Landrace pigs rested or exercised before exposure to halothane. *Br J Anesth* 48:821-829, 1976.
  21. Chapin JW, Chang C-L, Wingard DW: Coffee (caffeine) and porcine malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 55:A292, 1981.
  22. Ahern CP, Somers CJ, Wilson P, McLoughlin JV: The prevention of acute malignant hyperthermia in halothane-sensitive Piétrain pigs by low doses of neuroleptic drugs. *Proc 3rd Int Conf Prod Dis Farm Anim*:169-171, 1977.
  23. McGrath CJ, Rempel WE, Addis PB, Crimi AJ: Acepromazine and droperidol inhibition of halothane-induced malignant hyperthermia (porcine stress syndrome) in swine. *Am J Vet Res* 42:195-198, 1981.
  24. Harrison GG: The prophylaxis of malignant hyperthermia by oral dantrolene sodium in swine. *Br J Anesth* 47:62-65, 1975.
  25. Dershwitz M, Sreter FA: Azumolene reverses episodes of malignant hyperthermia in susceptible swine. *Anesth Analg* 70:253-255, 1990.
  26. Gronert GA, Milde JH, Theye PA: Dantrolene in porcine malignant hyperthermia. *Anesthesiology* 44:488-495, 1976.
  27. Kalow W, Britt BA, Terreau ME, Haist C: Metabolic error of muscle metabolism after recovery from malignant hyperthermia. *Lancet* 2:895-898, 1970.
  28. Ellis FR, Harriman DGF, Keaney NP, et al: Halothane-induced muscle contracture as a cause of hyperpyrexia. *Br J Anesth* 43:721-722, 1971.
  29. Gronert GA, Milde JH, Taylor SR: Porcine muscle responses to carbachol,  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor agonists, halothane or hyperthermia. *J Physiol* 307:319-333, 1980.
  30. Lister D, Sair RA, Will JA, et al: Metabolism of striated muscle of stress-susceptible pigs breathing oxygen or nitrogen. *Am J Physiol* 218:102-107, 1970.
  31. Ahern CP, Milde JH, Gronert GA: Electrical stimulation triggers porcine malignant hyperthermia. *Res Vet Sci* 39:257-258, 1985.
  32. European Malignant Hyperpyrexia Group: A protocol for the investigation of malignant hyperpyrexia (MH) susceptibility. *Br J Anesth* 56:1267-1269, 1984.
  33. North American Malignant Hyperthermia Group: Standardization of contracture testing protocol. *Anesth Analg* 69:437-443, 1989.
  35. Waldron-Mease E, Klein LV, Rosenberg H, Leitch M: Malignant hyperthermia in a halothane-anesthetized horse. *JAVMA* 179:896-898, 1981.
  36. Ebashi S, Endo M: Calcium ion and muscle contraction. *Prog Biophys Molec Biol* 18:123-183, 1968.
  37. Coronado R, Morrisette J, Sukhareva M, Vaughan DM: Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 266:C1485-C1504, 1994.
  38. Rios D, Pizarro G: Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol Rev* 71:849-908, 1994.
  39. Suda N, Penner R: Membrane repolarization stops caffeine-induced  $Ca^{2+}$  release in skeletal muscle cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 91:S725-S729, 1994.
  40. O'Brien PJ: Membrane defect in porcine malignant hyperthermia. PhD thesis. University of Minnesota. 1985.
  41. O'Brien PJ, Mickelson JR, Gronert GA, Louis CF: Malignant hyperthermia susceptibility: Hypersensitive calcium-induced Ca release mechanism of muscle. *Anesthesiology* 63:A270, 1985.
  42. O'Brien PJ: Porcine malignant hyperthermia susceptibility: Hypersensitive Ca-release mechanism of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Can J Vet Res* 50:318-328, 1986.
  43. O'Brien PJ: Porcine malignant hyperthermia susceptibility: Abnormal calcium homeostasis by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Isr J Vet Med* 42:245-252, 1986.
  44. O'Brien PJ: Calcium-transport function tests for the detection of malignant hyperthermia susceptibility in swine and dogs. *Proc 4th Cong Int Soc Anim Clin Biochem*:127-134, 1990.
  45. O'Brien PJ: Microassay for malignant hyperthermia susceptibility: Hypersensitive ligand-gating of the Ca channel in muscle sarcoplasmic reticulum causes increased amounts and rates of Ca release. *Molec Cell Biochem* 93:53-59, 1990.
  46. O'Brien PJ, Kalow BI, Ali N, et al: Compensatory increase in calcium extrusion activity of untreated lymphocytes from swine susceptible to malignant hyperthermia. *JAVMA* 51:1038-1043, 1990.
  47. Fujii J, Otsu K, Zorzato F, et al: Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253:448-451, 1991.
  48. MacLennan DH, O'Brien PJ: Diagnosis for Porcine Malignant Hyperthermia. Toronto, Sim and McBurney Patent and Trademark Agents, 1993. (Canada patent #2064091; USA patent #5358649)
  49. Wismer-Pedersen J: The pH-dependent water-binding capacity of pork muscle in relation to processing, in Sybesma W, van der Wal PG, Walstra P (eds): Recent Points of View on the Condition and Meat Quality of Pigs for Slaughter. Zeist, Holland, Research Institute of Animal Husbandry, 1968, pp 53-87.
  50. Ludvigsen J: Undersogelser over den sakaldte "muskeldeneration" hos svin I. 272. Beretning Forsogslab:112, 1954.
  51. Hupka E: Seuchenhaft auftretenden hühnerfleischähnliche muskeltartungen unter den schweinen. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 47:242-244, 1939.
  52. Ollivier L: Le determinisme genetique de l'hypertrophie musculaire chez le porc. *Ann Genet Sel Anim* 12:383-394, 1980.
  53. Webb AJ: The halothane test: A practical method of eliminating porcine stress syndrome. *Vet Rec* 106:410-412, 1980.
  54. Cassens RG, Marple DN, Eikelenboom G: Animal physiology and meat quality. *Adv Food Sci* 24:71-155, 1980.
  55. Judge MD, Briskey EJ, Cassens RG, et al: Adrenal and thyroid function in stress-susceptible pigs (*Sus domesticus*). *Am J Physiol* 214:146-151, 1968.
  56. Allen WM, Berrett S, Harding JDJ, Patterson DSP: Experimentally induced acute stress syndrome in Piétrain pigs. *Vet Rec* 87:64-69, 1970.
  57. Ollivier L, Sellier P, Monin G: Frequency of the malignant hyperthermia syndrome (MHS) in some French pig populations: Preliminary results. *Proc 3rd Int Conf Prod Dis Farm Anim*:208-210, 1977.
  58. McLoughlin P, Ahern CP, Butler M, McLoughlin JV: Halothane-induced malignant hyperthermia in Irish pig breeds. *Livestock Prod Sci* 7:147-154, 1980.
  59. McPhee CP, Takken A, D'Arcy KJ: Genetic variation in meat quality and the incidence of malignant hyperthermia syndrome in Large White and Landrace boars. *Aust J Exp Agric Anim Husband* 19:43-47, 1979.
  60. Webb AJ: Role of the halothane test in pig improvement. *Pig News Info* 2:17-23, 1981.
  61. O'Brien PJ, Zhang X, Shen H, Cory CR: Porcine stress syndrome: Demonstration of a cost-effective protocol for large-scale, DNA-based diagnosis of the etiologic mutation in 10,000 breeding stock of various breeds. *JAVMA* 203:842-851, 1993.
  62. Ollivier L, Sellier P, Monin G: Determinisme genetique du syndrome d'hyperthermie maligne chez le porc de Piétrain. *Ann Genet Sel Anim* 7:159-166, 1975.
  63. Smith C, Bampton PR: Inheritance of reaction to halothane anesthesia in pigs. *Genet Res Camb* 29:287-292, 1977.
  64. Minkema D, Eikelenboom G, van Eldik P: Inheritance of MHS-susceptibility in pigs. *Proc 3rd Int Conf Prod Dis Farm Anim*:203-207, 1977.
  65. Mabry JW, Christian LL, Kuthers DL: Inheritance of porcine stress syndrome. *J Hered* 72:429-430, 1981.
  66. Reik TR, Rempel WE, McGrath CJ, Addis PB: Further evidence on the inheritance of halothane reaction in pigs. *J Anim Sci* 57:826-831, 1983.
  67. O'Brien PJ, Ball RO, MacLennan DH: Effects of heterozygosity for the mutation causing porcine stress syndrome on carcass quality and live performance characteristics. *Proc 13th Int Pig Vet Soc Cong*:481, 1994.
  68. Nelson TE, Flewelling EH, Gloyna DF: Spectrum of susceptibility to malignant hyperthermia. *Anesth Analg* 62:545-552, 1983.
  69. O'Brien PJ, Shaunessy ML, Shen H, Derkesen J: Prevalence of the causative mutation of porcine stress syndrome in 25,000 breeding swine. *Proc 5th Int Cong Soc Anim Clin Biochem*:104, 1994.
  70. Gahne B, Juneja RK: Prediction of the halothane (Hal) genotypes of pigs by deducing Hal, Phi, Po2, Pgd haplotypes of parents and off-

- spring: Results from a large-scale practice in Swedish breeds. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 16:265-283, 1985.
71. Vogeli P, Kuhne R, Gervig C, et al: Prediction of the halothane genotypes with the aid of the S, PHI, HAL, H, PO2, PGD haplotypes of parents and offspring in Swiss Landrace pigs. *Zuchtungskunde* 60:24-37, 1988.
  72. Andresen E, Jensen P: Close linkage established between the HAL locus for halothane sensitivity and the PHI (phosphohexose isomerase) locus in pigs of the Danish Landrace breed. *Nord Vet Med* 29:502-504, 1977.
  73. Rasmussen BA, Christian LL: Blood types in pigs as predictors of stress susceptibility. *Science* 191:947-948, 1976.
  74. Rasmussen BA: Linkage of genes for PHI, halothane sensitivity, A-O inhibition, H red blood cell antigens and 6-PGD variants in pigs. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 12:207-209, 1981.
  75. Jorgensen PF, Hyldgaard-Jensen J, Moustgaard J: Phosphohexose isomerase (PHI) and porcine halothane sensitivity. *Acta Vet Scand* 17:370-372, 1976.
  76. Juneja RK, Gahne B, Eldfors-Lilja I, Andresen E: Genetic variation at a pig serum protein locus, Po-2 and its assignment to the Phi, Hal, S, H, Pgd linkage group. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 14:27-36, 1983.
  77. Davies W, Harbitz I, Fries R, et al: Porcine malignant hyperthermia carrier detection and chromosomal assignment using a linked probe. *Anim Genet* 19:203-212, 1988.
  78. Harbitz I, Chowdhary B, Thomsen PD, et al: Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus, to the 6p11-q21 segment of chromosome 6. *Genomics* 8:243-248, 1990.
  79. McCarthy TV, Healy JMS, Heffron JJA, et al: Localization of the malignant hyperthermia susceptibility locus to human chromosome 19q12-13.2. *Nature* 343:562-564, 1990.
  80. Otsu K, Philips MS, Khanna VK, et al: Refinement of diagnostic assays for a probable causal mutation for porcine and human malignant hyperthermia. *Genomics* 13:835-837, 1994.
  81. Allen WM: Losses of pigs due to the "acute stress syndrome" in the United Kingdom. *Acta Agric Scand Suppl* 21:495-499, 1979.
  82. Lawrle RE: Post-mortem glycolysis in normal and exudative longissimus dorsi muscles of the pig in relation to the so-called white muscle disease. *J Comp Pathol* 70:273-295, 1960.
  83. Berman M, Harrison GG, Bull AB, Kench JE: Changes underlying halothane-induced malignant hyperpyrexia in Landrace pigs. *Nature (Lond)* 225:653-655, 1970.
  84. Froystein T, Gronseth K, Nostvold SO, Standal N: Changes in muscle density in pigs during malignant hyperthermia syndrome measured by computerized tomography. *Zeltschr Tier Zuchtungs* 101:198-204, 1984.
  85. Kaufman RG, Wachholz D, Henderson D, Lochner JV: Shrinkage of PSE, normal, and DFD hams during transit and processing. *J Anim Sci* 46:1236-1240, 1978.
  86. Smith WC, Lesser D: An economic assessment of pale, soft, exudative musculature in the fresh and cured pig carcass. *Anim Prod* 34:291-299, 1982.
  87. Topel DG: Palatability and visual acceptance of dark normal and pale colored porcine *M. longissimus*. *J Anim Sci* 41:628-630, 1976.
  88. Buchter L, Zeuthen P: The effect of aging on the organoleptic qualities of PSE and normal loins. *Proc 2nd Int Symp Cond Meat Qual Pig*:247-254, 1971.
  89. Furulchi T, Furutama D, Hakamata Y, et al: Multiple types of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci* 14:4794-4805, 1994.
  90. Adeola O, Ball RO, House JD, O'Brien PJ: Regional brain neurotransmitter concentration in stress-susceptible pigs. *J Anim Sci* 71:968-974, 1993.
  91. O'Brien PJ, Kalow BI, Brown BD, et al: Porcine malignant hyperthermia susceptibility: Halothane-Induced increase in cytoplasmic free calcium of peripheral blood lymphocytes. *Am J Vet Res* 50:131-135, 1989.
  92. Gillard EF, Otsu K, Fujii J, et al: A substitution of cysteine for arginine 614 in the ryanodine receptor is potentially causative of human malignant hyperthermia. *Genomics* 11:751-755, 1991.
  93. Gillard EF, Otsu K, Fujii J, et al: Polymorphisms and deduced amino acid substitutions in the coding sequence of the ryanodine receptor (RYR1) gene in individuals with malignant hyperthermia. *Genomics* 13:1247-1254, 1992.
  94. Quane KA, Keating KE, Manning BM, et al: Detection of a novel common mutation in the ryanodine receptor gene in malignant hyperthermia: implications for diagnosis and heterogeneity studies. *Hum Molec Genet* 3:471-476, 1994.
  95. Zhang Y, Chen HS, Khenna VK, et al: A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease. *Nat Genet* 5:46-50, 1993.
  96. Quane HA, Healy JMS, Keating KE, et al: Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia. *Nat Genet* 5:51-55, 1993.
  97. Iles DE, Lehmann-Horn F, Scherer SW, et al: Localization of the gene encoding the  $\alpha^2/\delta$ -subunits of the L-type voltage-dependent calcium channel to chromosome 7q and analysis of the segregation of flanking markers in malignant hyperthermia-susceptible families. *Hum Molec Genet* 3:969-975, 1994.