

## UNA COMBINAZIONE MICROINCAPSULATA DI ACIDO SORBICO E COMPOSTI NATURALI IDENTICI RIDUCE LA PREVALENZA E LA PRESENZA DI *S. ENTERITIDIS* NEL POLLO DA CARNE

Grilli E.<sup>1</sup>, Massi P.<sup>2</sup>, Tosi G.<sup>2</sup>, Fiorentini L.<sup>2</sup>, Taddei R.<sup>2</sup>, Tugnoli B.<sup>1</sup>, Fantinati P.<sup>3</sup>, Piva A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*DIMORFIPA, Università di Bologna, Bologna*

<sup>2</sup>*ISZLER Sez Forlì*

<sup>3</sup>*Vetagro S.p.A., Reggio Emilia*

### Summary

The reduction of *Salmonella enteritidis* prevalence in broiler breeding is a priority in EU agricultural policies, as the treatment with antibiotics is forbidden by Regulation (EU) 2160/2003. Therefore, the aim of this study was to assess the efficacy of a microencapsulated blend of sorbic acid and nature-identical compounds (NIC) on the reduction of cecal prevalence and proliferation of *S. enteritidis* in experimental infected broilers chickens. Day-old female Ross 708 chicks, housed in 5 poultry isolators (20 birds/units), were assigned to 5 dietary treatments: positive control (challenged, not treated), AVP 0.3, AVP 1, AVP 2 and AVP 5 (birds challenged and treated with 300, 1000, 2000, and 5000 g/ton, respectively, of the microencapsulated blend AVIprof® , EU pat. 1391155B1, Vetagro S.p.A.). At day 7 of age birds were orally challenged with 10<sup>5</sup> CFU of *S. enteritidis* and after 7, 14, 24 days, 5, 5 and 10 birds per treatment were sacrificed, respectively, and caeca contents analysed for *S. enteritidis*. Data were analysed with one-way ANOVA. AVP 2 and AVP 5 treatments reduced *S. enteritidis* cecal prevalence by 30% and proliferation by 2 logs after 24 days post-infection (P<0.05). This study confirmed that intestinal delivery of microencapsulated sorbic acid and NIC can result in a reduction of *S. enteritidis* counts by 100-folds.

### INTRODUZIONE

La relazione “Community Summary Report on trends and sources of zoonosis and zoonotic agents and foodborne outbreaks in the European Union” riporta che la *Salmonella* è la causa più frequente di epidemie di origine alimentare nel 2008. La carne di pollame è il cibo maggiormente esposto, seguito dalla carne suina. I ceppi più frequentemente isolati di *Salmonella* nei focolai sono stati *S. enteritidis* e *S. typhimurium* nelle carni di pollame e suino rispettivamente.

I numeri indicano una leggera diminuzione nelle persone colpite in caso di focolai di *Salmonella* rispetto al 2007 (131.468 casi nel 2008 vs 151.998 nel 2007), e questo trend, confermato negli ultimi quattro anni, potrebbe essere legato all’applicazione di programmi di monitoraggio nazionali, all’interno di ciascun paese, come stabilito dal Reg. CE 2160/2003. Tale regolamento si prefigge di garantire “la messa in atto di misure efficaci per rilevare e controllare la salmonella e altri agenti zoonotici in tutte le fasi pertinenti la produzione, trasformazione e distribuzione, in particolare a livello della produzione primaria, anche in mangimi, al fine di ridurre la presenza e il pericolo per la salute pubblica “.

Mentre sono stati ottenuti importanti risultati nel corso degli anni per quanto riguarda

le galline ovaiole, dove sono stati raggiunti gli standard europei in molti Paesi, non sono stati raggiunti tali livelli significativi di riduzione della prevalenza di *Salmonella* per i polli da carne.

Pertanto, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia di una miscela di acido sorbico e di Composti Naturali Identici (NIC) sulla riduzione della prevalenza cecale e la proliferazione di *S. enteritidis* in polli da carne infettati sperimentalmente.

## **MATERIALI E METODI**

In tale studio sono stati utilizzati cento broilers Ross 708 femmine, di un giorno di vita e provenienti da un incubatoio dell'Emilia Romagna. Gli animali sono stati stabulati in modo casuale in cinque isolatori per specie aviari (Montair Andersen HM1500®) (20 animali/isolatore) dotato di abbeveratoi, lampade di riscaldamento e di una sistema per la filtrazione dell'aria in entrata ed in uscita. Ad ogni unità di isolamento è stato assegnato uno dei 5 trattamenti alimentari così stabiliti: controllo (non trattato), AVP 0.3, AVP 1, AVP 2 e AVP 5 (animali rispettivamente trattati con 300, 1000, 2000 e 5000 gr/T, della miscela microincapsulata di acido sorbico e di Composti Naturali Identici, AVIprof®, brevetto UE. 1391155B1, Vetagro S.p.A. Italia). La miscela è stata introdotta in un mangime in farina e fornita agli animali sin dall'inizio dello studio. Il mangime è stato fornito *ad libitum*. A 7 giorni di vita i polli sono stati sottoposti ad infezione *per os* con una dose infettante di  $10^5$  unità formanti colonia (UFC) di *S. enteritidis*. A 7, 14, e 24 giorni post-infezione sono stati sacrificati 5, 5 e 10 capi per ogni trattamento rispettivamente, al fine di analizzare la presenza e la conta delle UFC di *S. enteritidis* nel contenuto cecale secondo il metodo ISO 6759:2002, annex D. È importante sottolineare come per l'infezione sia stato utilizzato un ceppo di campo isolato da galline ovaiole.

I dati sono stati sottoposti all'analisi statistica, tramite test ANOVA ad una via, seguito dal post-Neuman-Keuls test utilizzando GraphPad Prism Software 4.0. Le differenze sono state indicate come significative per  $P < 0,05$ . La prevalenza di *S. enteritidis* a 24 giorni post-infezione è stata analizzata mediante test Chi-quadro.

Lo studio è stato condotto presso la Sezione Diagnostica di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna (ISZLER).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

A 7 giorni post-infezione non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i diversi gruppi, ma il trattamento AVP 2 dimostrava un livello di UFC più alto (+1,8 log) rispetto al controllo.

Dopo 14 giorni post-infezione nessuno dei gruppi mostrava differenze statisticamente significative rispetto al controllo. Tuttavia dopo 24 giorni c'è stata una significativa riduzione dei livelli di *S. enteritidis* (pari a 2 log) per entrambi i trattamenti AVP 2 e AVP 5 rispetto al controllo, mentre il trattamento AVP 0,3 non ha dimostrato differenze significative.

Il trattamento AVP 1 ha mostrato una riduzione numerica di 0,5 log senza raggiungere significativi valori di P (Fig. 1).

Durante il corso della prova non si è potuto evidenziare una riduzione della colonizzazione cecale di *S. enteritidis* nei broilers del gruppo di controllo, mentre la riduzione è stata evidente negli animali alimentati con dosi più alte di AVIprof® (Fig. 2). La prevalenza di *S. enteritidis*, 24 giorni post infezione, è stata

significativamente ridotta dal 100% degli animali gruppo di controllo, trattamento AVP 0,3, e AVP 1.0 al 70% nei trattamenti AVP 2,0 e AVP 5,0 ( $P < 0,01$ ). Ciò sta ad indicare una negativizzazione del 30% degli animali quando trattati con 2,0 e 5,0 Kg di AVIprof®.

I dati inoltre hanno messo in evidenza come nel corso del periodo sperimentale la supplementazione del mangime con AVIprof® si è dimostrata in grado di sortire un effetto positivo per gli animali. Tali risultati confermano ciò già visto in precedenza su animali SPF dove si è applicato lo stesso prodotto microincapsulato per il controllo da *S. hadar* (Grilli et. 2009).

Il risultato comune nei due studi è che, mentre non vi è alcun effetto durante i primi giorni post-infezione, si assiste ad una marcata riduzione di *S. enteritidis* in un periodo a medio termine dall'inizio del challenge (20-24 giorni). Nello studio precedente (Grilli et al., 2009), l'inibizione di 1 log di *S. Hadar* è stato raggiunto a 20 giorni post-infezione con tutti i dosaggi di prova (da 300 ppm a 5000 ppm nel mangime), mentre in questo c'è stata una riduzione marcata solo a partire dal dosaggio di 2000 ppm sino a 5000 ppm.

La ragione di questa discrepanza potrebbe essere dovuta a due diverse ragioni. La prima potrebbe essere la differente specie di salmonella utilizzata (*S. Hadar* nel primo e *S. enteritidis* nel secondo) con differenti sensibilità dei diversi ceppi alla combinazione di acidi ed aromi testata. Il secondo punto è che la colonizzazione *S. Hadar* nella prima prova è risultata numericamente minore se confrontata a quella ottenuta nella seconda prova con *S. enteritidis* (2 logs/g vs 5 logs/g di contenuto cecale riferito ai polli di controllo). Infatti, nel primo studio, il picco colonizzazione è stato raggiunto dopo 10 giorni post-infezione con un valore di 3,2 logs/g, mentre nel secondo studio è stato al suo livello massimo a 7 giorni con valori di 7 logs, e quindi la concentrazione di la miscela necessaria per ridurre efficacemente i livelli di *S. enteritidis* sono stati necessariamente superiori.

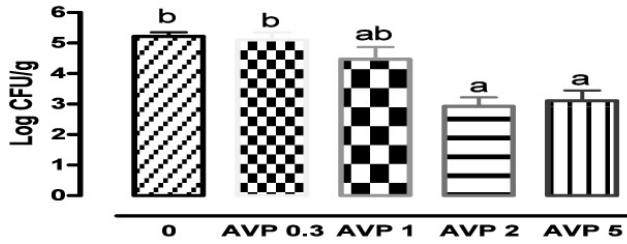
## CONCLUSIONI

In conclusione, AVIprof® è stato in grado di ridurre efficacemente di 2 log la presenza di *S. enteritidis* in infezione sperimentale su broiler commerciali di 31 giorni di età. Tale combinazione di acidi e Composti Naturali Identici, ha inoltre consentito una riduzione del 30% dei polli positivi a Salmonella. Tale colonizzazione inferiore a livello cecale nei polli da carne potrebbe permettere una minore contaminazione della carcassa al macello e quindi una diminuzione del rischio per il consumatore.

## BIBLIOGRAFIA

1. EFSA. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* (2010), 1496.
2. GRILLI, E., MASSI, P., VANDI, L. AND A. PIVA. 2009. A microencapsulated blend of organic acids and natural identical compounds reduced the prevalence and presence of *S. hadar* in SPF-chicks 17. European Symposium on Poultry Nutrition, August, 23-27, 2009, Edinburgh, Scotland.
3. THE EUROPEAN PARLIAMENT AND THE COUNCIL. Regulation (EC) 2160/2003 of 17 November 2003 on the control of Salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. Official Journal of European Union- 325/1-15.

**Figura 1.** Conta di *S. enteritidis* nei contenuti cecali dopo 24 giorni post-infezione. Diverse lettere sulle colonne indicano differenze significative ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** Conta di *S. enteritidis* nei contenuti ciecali nel corso del tempo del periodo sperimentale. L'asterisco indica una differenza significativa rispetto al controllo ( $P < 0,05$ ).

