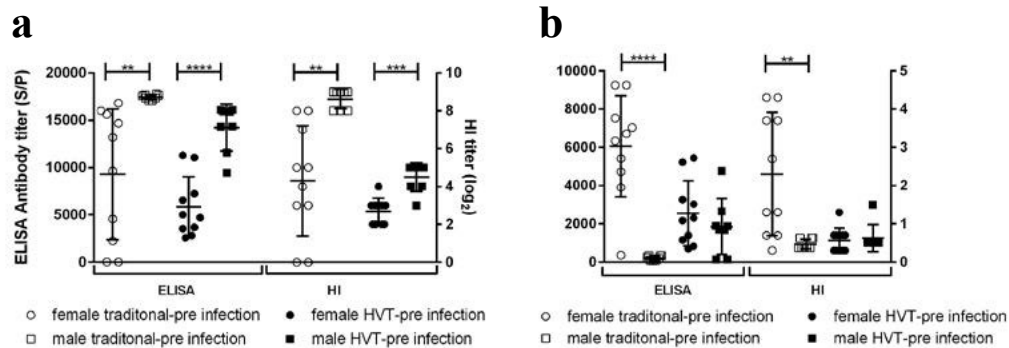


Fig.2 a) Titoli anticorpali in ELISA e in HI (log2) dei gruppi vaccinali, e analisi statistica; b) Deviazioni di ciascun titolo anticorpale (in ELISA e in HI) dalla media del gruppo di appartenenza.

* Significativamente per valori di $p < 0,05$, ** Significativamente per valori di $p < 0,01$, *** Significativamente per valori di $p < 0,001$.



BIBLIOGRAFIA

- Capua, I., Dalla, P. M., Mutinelli, F., Marangon, S., & Terregino, C. (2002). Newcastle disease outbreaks in Italy during 2000. *The Veterinary Record*, 150(18), 565–8. <https://doi.org/10.1136/vr.150.18.565>
- OIE Terrestrial Manual, Edition 2012. *Chapter 2.3.14 Newcastle Disease (infection with Newcastle Disease virus)*.
- Esaki, M., Godoy, A., Rosenberger, J. K., Rosenberger, S. C., Gardin, Y., Yasuda, A., & Dorsey, K. M. (2013). Protection and antibody response caused by turkey herpesvirus vector Newcastle disease vaccine. *Avian Diseases*, 57(4), 750–755. <https://doi.org/10.1637/10540-032613-Reg.1>
- Kapczynski, D. R., Afonso, C. L., & Miller, P. J. (2013). Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 41(3), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>
- Palya, V., Kiss, I., Tatár-Kis, T., Mató, T., Felföldi, B., & Gardin, Y. (2012). Advancement in Vaccination Against Newcastle Disease: Recombinant HVT NDV Provides High Clinical Protection and Reduces Challenge Virus Shedding with the Absence of Vaccine Reactions. *Avian Diseases*, 56(2), 282–287. <https://doi.org/10.1637/9935-091511-Reg.1>
- Palya, V., Tatár-Kis, T., Mató, T., Felföldi, B., Kovács, E., & Gardin, Y. (2014). Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158(1–2), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.11.008>

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI UNA MISCELA DI ACIDI ORGANICI E FITOTERAPICI NEL CONTROLLO DELL'INFEZIONE DA *ESCHERICHIA COLI* NEL TACCHINO

Parigi M.¹, Massi P.¹, Fiorentini L.¹, Tosi G.¹, Romboli C.¹, Vandi L.², Bocciero R.¹, Fregnani G.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, sezione di Forlì;

²Biomim Holding GmbH, Industriestrasse 21, 3130 Herzogenburg, Austria

ABSTRACT

Colibacillosis is a systemic multifactorial disease caused by *E. coli* that still represents a major problem in the turkey industry worldwide. The aim of the present study was to test the effects of an enhanced feed acidifier on the replication of an antibiotic resistant *E. coli*. Ninety-six turkey poults of one day of age were randomly assigned to 4 poultry isolators (24 animals/isolator), fed with 4 different dietary treatments for 30 days and orally challenged with $1,38 \times 10^8$ cfu/mL of an antibiotic resistant *E. coli* strain. At day 20 and day 30, birds were euthanized in order to evaluate the presence of gross lesions of colibacillosis and an aliquot of their intestinal content and liver has been examined by bacteriological analysis. At any interval of the trial, birds of Group 2, treated with the highest dosage of acidifier, presented a lower *E. coli* population, both in the intestine and in the liver than the other groups and absent or mild lesions of colibacillosis. Thus, since feed acidifiers are included in poultry diets as alternative to antibiotic growth promoters, this *E. coli* reduction could lead to a reduced environmental contamination and, consequently, limit the horizontally diffusion of the pathogen.

INTRODUZIONE

Con colibacillosi si intende una malattia sistemica multifattoriale causata da *E. coli* che rappresenta, ancora oggi, una delle maggiori problematiche nell'allevamento dei tacchini a livello mondiale, a causa delle gravi conseguenze in termini di mortalità e ridotta conversione alimentare dei gruppi colpiti. La malattia si può presentare con diverse forme cliniche, quali colisetticemia, aereosacculite, perepatite e percardite. La frequenza e la gravità dell'infezione dipendono da tre fattori principali: lo stato sanitario del gruppo di animali, la presenza di fattori ambientali predisponenti e la virulenza del ceppo di *E. coli* coinvolto. Nonostante gli antibiotici siano stati, e sono tutt'ora, utilizzati per contrastare la replicazione del batterio, è necessario sia ridurre il loro utilizzo sia identificare valide sostanze alternative, in relazione al crescente numero di ceppi di *E. coli* antibiotico resistenti isolati proprio in corso di focolai di malattia (Huff et al., 2013). Lo scopo di questo studio è stato, quindi, quello di testare e valutare, *in vivo*, gli effetti di un acidificante alimentare potenziato sulla replicazione di un *E. coli* antibiotico resistente.

MATERIALI E METODI

Progettazione dello studio. Novantasei tacchini di un giorno di età (femmine, Big 6 Aviagen®) sono stati assegnati random a 4 isolatori (24 animali in ogni isolatore) corrispondenti a 4 diverse diete; in ogni isolatore, 4 animali non sono stati identificati. L'acqua e l'alimento somministrati agli animali sono stati testati per l'assenza di *E.*

coli, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium* spp. e *Salmonella* spp. Dal giorno 1 al giorno 3 dell'esperimento, tutti gli animali sono stati trattati con colistina in acqua di abbeverata (colistina 12%, 2ml/litro come previsto dalla casa produttrice). A partire dal giorno 4 fino alla fine dell'esperimento (30 giorni), ai 4 gruppi sono state somministrate le seguenti diete:

1. Controllo negativo (CN): dieta standard senza nessun supplemento;
2. Controllo positivo (CP): dieta standard + enrofloxacin 0,5 ml per litro di acqua;
3. Gruppo trattamento 1 (GT1): dieta standard + 1 kg per ton di dieta di additivo alimentare;
4. Gruppo trattamento 2 (GT2): dieta standard + 2 kg per ton di dieta di additivo alimentare.

L'additivo alimentare testato è un prodotto commerciale, Biotronic® Top3 (Biomin) composto da un complesso permeabilizzante (Biomin® Permeabilizing Complex, Biomin) più una miscela di acidi organici (acido formico, propionico e acetico) e un fitochimico (cinnemaldeide). Al giorno 11, tutti gli animali in ogni gruppo sono stati infettati per via orale con $1,38 \times 10^8$ ufc (unità formanti colonia) per mL di *E.coli*. Il ceppo usato era un ceppo di campo, sierotipo O78, resistente all'enrofloxacin ed isolato nel 2014 durante un focolaio di colisetticemia in un allevamento di tacchini. Prima dell'infezione con *E.coli* e in seguito al trattamento con la colistina, i 4 animali non identificati in ogni isolatore sono stati soppressi mediante dislocazione cervicale ed il loro contenuto intestinale analizzato mediante analisi batteriologica così da confermare l'assenza sia del sierotipo di *E.coli* inoculato sia di qualsiasi altro ceppo di *E.coli*. In seguito, al giorno 20 e 30 dell'esperimento, 10 tacchini in ogni isolatore sono stati soppressi mediante dislocazione cervicale ed il contenuto intestinale esaminato mediante analisi batteriologica.

Valutazione delle lesioni. Durante l'esame necroscopico degli animali, l'eventuale presenza di lesioni macroscopiche al fegato sono state valutate utilizzando il seguente punteggio modificato da Van Eck e Goren (1991): 0, assenza di lesioni; 0,5 presenza di una lesione infiammatoria circolare a capocchia di spillo bianca o marrone; 1 presenza di due o più lesioni infiammatorie circolari a capocchia di spillo; 2, presenza in vari organi di un sottile strato di essudato fibrinoso; 3, massiva presenza di essudato fibrinoso denso. È stato, quindi, calcolato il punteggio medio delle lesioni rilevate in ciascun gruppo.

Conta delle colonie di *E.coli* ed *Enterobacteriaceae*. Un grammo di contenuto intestinale ed un grammo di fegato sono stati diluiti in acqua peptonata e diluiti serialmente. Da ciascun campione, 100 μ L sono stati seminati su Triptone Bile Agar con glucuronide (TBX-agar) per l'isolamento e la conta di *E.coli* e su Violet Red Bile Glucosio Agar (VRBGA) per l'isolamento e la conta delle *Enterobacteriaceae*. I risultati sono stati espressi come unità formanti colonia (ufc) per grammo di tessuto o contenuto intestinale. Le colonie di *E.coli* isolate al giorno 20 e 30 sono state successivamente tipizzate sierologicamente (mediante il test della siero agglutinazione utilizzando antisieri specifici) per l'antigene O così da verificare che le colonie di *E.coli* isolate corrispondessero al sierotipo inoculato.

Analisi statistica. Le conte batteriche sono state trasformate e analizzate mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis utilizzando il software SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Il numero di animali con le lesioni riferibili a colibacillosi sono stati confrontati mediante il test del Chi-Quadro, aggiustato mediante la correzione di Yates, mentre la media delle lesioni sono state confrontate utilizzando il test di Mann-Whitney.

La significatività statistica è stata considerata per valori di $P \leq 0,05$.

RISULTATI

Conte batteriche. A qualsiasi intervallo dell'esperimento, il numero di colonie di *Enterobacteriaceae* isolate nel tratto intestinale dei tacchini del GT2 è risultato inferiore ($P \leq 0,05$) rispetto agli animali dei gruppi GT1 e CP. Al giorno 30 dell'esperimento, il numero di ufc isolate dagli intestini degli animali del GT2 è risultato significativamente inferiore rispetto a quello isolato dai gruppi CN e CP ($P \leq 0,05$). Colonie di *E.coli* sono state isolate negli intestini di tutti gli animali infettati, a prescindere dalla dieta ricevuta (Fig. 1-2) e non sono state mai rilevate differenze statisticamente significative tra il numero di colonie isolate nei gruppi CN, CP e GT1. Al contrario, sia al giorno 20 sia al giorno 30 dell'esperimento, le ufc di *E.coli* isolate dagli animali del GT2 sono risultate statisticamente inferiori ($P \leq 0,05$) delle ufc isolate, rispettivamente, dai tacchini del gruppo GT1 e dei gruppi di controllo. Per quanto riguarda, invece, la ricerca di *E.coli* dai fegati (Fig. 1-2), al giorno 20 non sono state isolate colonie dai fegati degli animali trattati con l'additivo alimentare al dosaggio di 2 kg/ton di alimento. Al giorno 30, invece, il numero di colonie di *E.coli* rinvenute dai fegati degli animali di questo gruppo sono risultate non solo inferiori rispetto ai gruppi CP e GT2, ma anche statisticamente inferiori rispetto al CN ($P \leq 0,05$). La sierotipizzazione dei ceppi batterici isolati durante l'esperimento ha confermato la presenza di *E.coli* O78 in tutti gli animali.

Lesioni macroscopiche. Al giorno 20 dell'esperimento, il 60% degli animali dei gruppi CN e CP e il 20% degli animali del gruppo GT1 hanno mostrato lesioni riferibili a colibacillosi, con un punteggio medio di 0.75, 0.50 e 0.17 rispettivamente (Fig.3). Al giorno 30, anche gli animali del GT2 hanno presentato lesioni (60% dei tacchini) con un punteggio medio di 0.30, mentre tutti gli animali degli altri gruppi presentavano lesioni con un punteggio di 0.89 nel CN, 0.85 nel CP e 0.75 nel GT1 (Fig.3); queste differenze sono risultate statisticamente significative ($P \leq 0,05$).

DISCUSSIONI

L'attività antibatterica nei confronti dei batteri Gram-negativi dei componenti dell'additivo alimentare testato (Biotronic® Top 3, Biomin) era già stata dimostrata in precedenza mediante test *in vitro* (Riemensperger et al., 2012); da questi risultati preliminari, infatti, era stato desunto che i componenti del prodotto risultavano più efficaci se usati combinati, dimostrando un sinergismo di azione. Infatti, il complesso permeabilizzante contenuto nell'acidificante, destabilizzando la membrana esterna dei batteri Gram-negativi, facilita la penetrazione della cinnemaldeide e degli acidi organici all'interno delle cellule batteriche. La cinnemaldeide risulta avere un'importante azione antibatterica in quanto si lega alla proteina FtsZ, implicata nel fenomeno della divisione cellulare, inibendo, quindi, la replicazione dei batteri (Domadia et al., 2007). Il meccanismo di azione degli acidi organici nei confronti dei batteri è duplice: in primo luogo, agiscono riducendo il pH dell'alimento ed inibendo la crescita batterica; in secondo luogo, nella loro forma non dissociata riescono a penetrare la parete cellulare batterica, andandone ad alterare le funzioni vitali (Hansen et al., 2007). In questo studio *in vivo*, il gruppo di animali trattato con l'acidificante al dosaggio di 2kg/ton di alimento ha presentato una riduzione del numero di colonie di *E.coli* e di *Enterobacteriaceae*, isolate dal tratto intestinale, rispetto agli animali dei gruppi di controllo. Quindi, possiamo affermare che, alle nostre condizioni sperimentali, questo dosaggio è risultato efficace nel controllare la

replicazione di un ceppo antibiotico resistente di *E.coli*. In uno studio precedente, abbiamo testato l'efficacia dello stesso prodotto nei confronti di un ceppo di *Salmonella* Enteritidis inoculata sperimentalmente, per via oculo nasale, in un gruppo di polli SPF ed entrambi i dosaggi del prodotto, sia 1kg/ton sia 2kg/ ton di alimento, avevano portato ad una riduzione significativa della concentrazione cecale di *Salmonella* nei gruppi trattati rispetto ai gruppi di controllo (comunicazione personale). Considerando che, sia *E.coli* sia *Salmonella* Enteritidis sono batteri Gram-negativi, possiamo, quindi, desumere che la minore efficacia del prodotto al dosaggio di 1 kg/ton rilevata in questo studio sia legata alla elevata resistenza del ceppo di *E.coli* inoculato, nello specifico un ceppo di campo antibiotico resistente naturalmente selezionato. Nonostante il numero di colonie di *E.coli* isolate dal tratto intestinale del gruppo GT2 fosse significativamente inferiore, abbiamo ugualmente rilevato la traslocazione del batterio in sede epatica anche nel GT2, anche se in minor misura rispetto agli altri gruppi. Ad ogni modo, la dimostrazione della scarsa replicazione batterica negli animali del GT2 è stata altresì dimostrata dalle blande lesioni anatomopatologiche rilevate negli animali in sede necroscopica (Fig.3). Inoltre, nonostante la supplementazione del prodotto non abbia inibito completamente la replicazione di *E.coli*, possiamo ipotizzare che una riduzione di 2 log₁₀ del numero di colonie isolate rispetto ai gruppi di controllo possa portare ad una riduzione della sua eliminazione nell'ambiente e, quindi, limitare la trasmissione orizzontale del patogeno in allevamento (Grilli et al., 2011). In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio sono promettenti e incoraggianti; in particolare, considerando sia l'importanza del patogeno utilizzato sia il suo essere antibiotico resistente, l'additivo alimentare testato può essere ritenuto una valida alternativa agli antibiotici nel controllo degli agenti patogeni intestinali in una panorama zootecnico mondiale sempre più antibiotic-free.

BIBLIOGRAFIA

Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. (2007). Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical. Pharmacology* 74:831–840.

Grilli E., Tugnoli B., Fromigoni A., Massi P., Fantinati P., Tosi G. and Piva A. (2011). Microencapsulated sorbic acid and nature-identical compounds reduced *Salmonella* Hadar and *Salmonella* Enteritidis colonization in experimentally infected chickens. *Poultry Science* 90 :1676–1682.

Hansen C.F., Riis A.L., Bresson S., Hojbjerg O., Jensen B.B. (2007). Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science* 108: 206–209.

Huff G.R., Huff W.E., Jalukar S., Oppy J., Rath N.C. and Packialakshmi B. (2013). The effects of yeast feed supplementation on turkey performance and pathogen colonization in a transport stress/*Escherichia coli* challenge. *Poultry Science* 92:655-662.

Riemensperger A.V., Bachinger D., Schaumberger S., Urbaityte R., Pastiner S., (2012). The effect of an organic acid blend, cinnamaldehyde and a permeabilising substance on the inhibition of bacterial growth in vitro and growth performance of weaning pigs. *Veterinarija Jr Zootechnika (Vet Med Zoot)*. T. 60:82, 59-66.

Van Eck J.H.H. and Goren E. (1991). An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: Vaccinal reaction in comparison with other lentogenic Newcastle disease vaccines. *Avian Pathology*, 20:3, 497-507.

Fig. 1: Colonie di *E.coli* isolate nei 4 gruppi da intestino e fegato al giorno 20 dell'esperimento

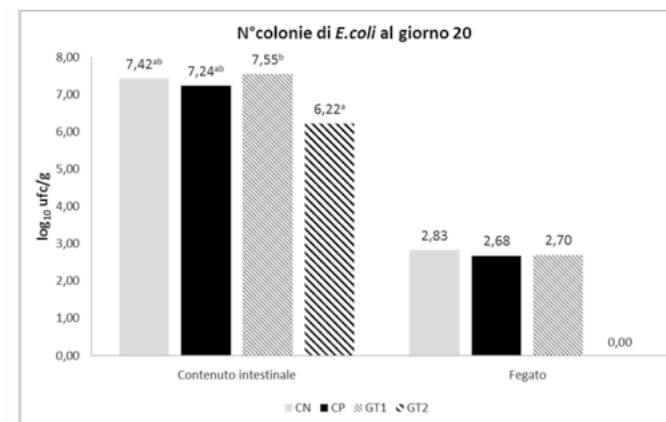


Fig. 2: Colonie di *E.coli* isolate nei 4 gruppi da intestino e fegato al giorno 30 dell'esperimento

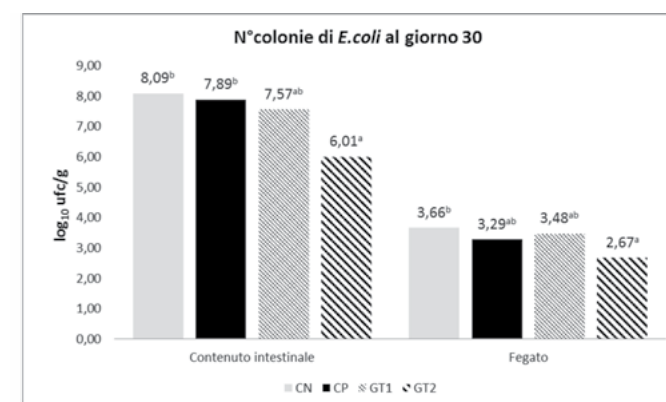


Fig. 3: Valutazione delle lesioni epatiche in sede necroscopica

