

MISCELE MICROINCAPSULATE DI SOSTANZE AROMATIZZANTI E ACIDI ORGANICI COME SUPPLEMENTI ALIMENTARI PER IL CONTROLLO DELL'ENTERITE NECROTICA DA CLOSTRIDIUM PERFRINGENS IN POLLI DA CARNE

Tugnoli B.¹, Piva A.^{1,2}, Grilli E.^{2,3}

¹ Vetagro S.p.A., via Porro, 2 – 42124 – Reggio Emilia (Italy);

² DIMEVET, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 – Ozzano dell'Emilia (BO), Italy;

³ Vetagro, Inc., 17 E. Monroe St., Suite #179, 60604 Chicago (IL), USA

Summary

Necrotic enteritis (NE) is one of the most common diseases in poultry production worldwide, leading to sub-optimal performance and considerable economic losses. Botanicals are progressively gaining importance as feed additives for their biological properties among which antibacterial and anticoccidial, while organic acids are well-known antimicrobials. The aim of this study was to reproduce a NE challenge model caused by *Eimeria* coccidia and *Clostridium perfringens* (CP) in broilers and evaluate the effects of microencapsulated blends of botanicals and organic acids in comparison with conventional drug treatments.

A total of 2,500 day-old chicks (Cobb 500) were vaccinated for coccidiosis with Coccivac®-B52, divided in pens (50 birds/pen) and assigned to 5 groups (10 pens/group): CTR group, fed a control diet; AMP group, fed a diet with 100 ppm of Amprolium; BMD group, fed a diet with 55 ppm of bacitracin; TRT1, fed a diet supplemented with 400 g/MT of Prototype 1; TRT2, fed a diet supplemented with Prototype 1 at 400 g/MT and Prototype 2 at 500 g/MT. Prototype 1 and Prototype 2 are a two microencapsulated blends of botanicals and organic acids (Prototype 1) and only botanicals (Prototype 2) manufactured by Vetagro. All the animals were challenged first with cocci through an oral inoculation with *E. maxima* (5,000 oocysts) at day 14, then with CP (alpha toxin and netB toxin positive, 10⁸ CFU) orally administered for 3 days (d19, 20, and 21). The study lasted 42 days with small intestine lesions scored at d21 from 3 birds/pen, fecal oocysts counted at day 28 and growth performance recorded throughout the study. Data were analyzed with ANOVA and differences considered significant at P<0.05.

No differences in growth performance were observed before the challenge. From d14 to d28, immediately after the challenge, all the treated groups showed improved growth with higher weight gains and lower feed conversion ratio values compared to CTR group (P<0.01). Overall (0-42 days), the group TRT2 had the highest weight gain although only numerically (P=0.17), while FCR values were significantly reduced in particular by TRT2 and BMD (1.68 both) followed by TRT1 and AMP (1.73 both) compared to CTR group (1.84). All the treatments reduced overall mortality and mortality due to NE compared to CTR (P<0.0001). Compared to CTR, small intestine lesions score was reduced particularly by AMP and TRT2, while *E. maxima* counts were significantly lower only in TRT2 group (P<0.01).

To conclude, the microencapsulated blends of botanicals and organic acids used in this study have the potential to contain loss of performance and lesions associated with NE challenge in broiler chickens to the same extent of conventional drugs.

INTRODUZIONE

L'enterite necrotica (EN) è ritenuta una delle principali minacce per l'industria avicola globale, con ingenti perdite economiche. Si tratta di una patologia intestinale causata dalla proliferazione di ceppi tossigenici del batterio Gram-positivo, anaerobio, sporigeno *Clostridium perfringens* e che vede nella coccidiosi e in particolare nel danno alla mucosa intestinale causato da *Eimeria* spp. il principale fattore predisponente (Paiva & McElroy, 2014; Quiroz-Castaneda & Dantan-Gonzalez, 2015; Timbermont et al., 2011). L'EN nella sua forma clinica acuta causa severe lesioni intestinali e alti tassi di mortalità, mentre nella sua forma sub-clinica riduce le performance di crescita degli animali (Van Immerseel et al., 2004). Le restrizioni di tipo legislativo e la crescente diffusione di sistemi di produzione senza l'uso di antibiotici hanno portato da un lato ad un aumento dell'incidenza dell'EN e dall'altro ad un accresciuto l'interesse verso la ricerca di strategie alternative per controllare il problema (Van Immerseel et al., 2016). Gli acidi organici sono ampiamente utilizzati come antimicrobici alternativi agli antibiotici convenzionali, mentre i composti vegetali e i prodotti derivati da piante, collettivamente definiti fitogenici, trovano sempre più ampio utilizzo nella nutrizione animale date le loro molteplici proprietà biologiche, quali antibatteriche, anticoccidiche, anti-infiammatorie e anti-ossidanti (Giovagnoni et al., 2019; Rossi et al., 2020; Felici et al., 2020).

L'obiettivo di questo studio è stato riprodurre nei polli da carne un modello di enterite necrotica causata da coccidi di *Eimeria* e *Clostridium perfringens* e valutare l'effetto di due miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti e acidi organici a confronto con trattamenti farmacologici convenzionali.

MATERIALI E METODI

Un totale di 2500 polli da carne maschi (Cobb 500) al giorno 0 di vita sono stati vaccinati per coccidiosi (Coccivac®-B52), allocati in box (50 animali/box) e assegnati a 5 gruppi sperimentali (10 box/gruppo):

- 1) Gruppo CTR, alimentato con una dieta standard;
- 2) Gruppo AMP, alimentato con una dieta standard supplementata con 100 ppm di Amprolium;
- 3) Gruppo BMD, alimentato con una dieta standard supplementata con 55 ppm di Bacitracina
- 4) Gruppo TRT1, alimentato con una dieta standard supplementata con Prototipo 1 a 400 g/ton;
- 5) Gruppo TRT2, alimentato con una dieta standard supplementata con Prototipo 1 a 400 g/ton e Prototipo 2 a 500 g/ton.

Le diete sono state fornite *ad libitum* a partire dall'accasamento secondo questo piano alimentare: fase starter (giorno 0-14), fase grower (giorno 14-28), fase finisher (giorno 28-36), fase withdrawal (giorno 36-42). Le diete consistevano in mangimi commerciali, non medicati, formulati sulla base delle indicazioni

NRC e fornite come pellet sbriciolato (starter) o come pellet (grower, finisher e withdrawal). Prototipo 1 e Prototipo 2 sono due miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti e acidi organici (Prototipo 1) o solo sostanze aromatizzanti (Prototipo 2) prodotte da Vetagro S.p.A.

Tutti gli animali in prova sono stati sottoposti ad un challenge per indurre enterite necrotica attraverso la somministrazione orale di *E. maxima* (5000 oocisti/animale) al giorno 14 seguita dalla somministrazione orale di *C. perfringens* (ceppo di campo alpha toxin e netB toxin positivo, 10^8 CFU) per 3 giorni consecutivi, giorno 19, 20 e 21. Al giorno 21, 3 animali/box sono stati sacrificati ed esaminati per le lesioni intestinali da enterite necrotica secondo un metodo di score da 0 a 3 di gravità crescente con punteggio 0 per intestino normale, 1 per intestino con perdita di tono e lieve strato di muco, 2 per intestino con severa enterite necrotizzante e 3 per intestino con estrema enterite necrotizzante e presenza di sangue nel lume (Hofacre et al., 1998). Al giorno 28 sono stati raccolti campioni fecali da ogni box per la conta del numero di oocisti per grammo (OPG) di feci mediante metodica Mc Master al fine di determinare l'eliminazione fecale di *E. acervulina*, *E. maxima* ed *E. tenella*.

I box sono stati monitorati quotidianamente per controllare eventuali animali morti oppure da abbattere, di cui è stato registrato il peso e la causa di morte attraverso esame necroscopico. Per determinare le performance di crescita, sono stati registrati l'alimento somministrato e il peso vivo per box ai giorni 0, 24, 28, 36 e 42. Conseguentemente sono stati calcolati parametri di crescita quali l'ingestione alimentare, l'incremento ponderale e l'indice di conversione alimentare aggiustato sulla base della mortalità.

I dati sono stati analizzati con ANOVA seguita da test di Tukey (Graph Pad Prism 6; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Le differenze sono state considerate significative per $P < 0.05$ e le tendenze per $0.05 < P \leq 0.10$.

RISULTATI

Performance di crescita

I risultati delle performance di crescita sono riportati nella Tabella 1. Nel periodo 0-14 giorni, prima dell'infezione con *E. maxima* e *C. perfringens*, non sono state osservate differenze nei parametri di crescita dei gruppi. Dal giorno 14 al giorno 28, durante ed immediatamente dopo il challenge, tutti i gruppi trattati hanno mostrato una crescita migliore con valori di accrescimento ponderale più alti (in media +95 g / animale) e indici di conversione più bassi (in media -0.15) rispetto al gruppo di controllo ($P < 0.01$). Anche nel periodo 28-36 giorni è stata osservata una tendenza a ridotti indici di conversione rispetto al controllo per i gruppi BMD, TRT1 e TRT2 ($P = 0.10$). Complessivamente (giorni 0-42), il gruppo TRT2 ha mostrato il più alto accrescimento ponderale rispetto al gruppo CTR (+129 g/animale) seppur solo numericamente ($P = 0.17$), mentre gli indici di conversione sono stati ridotti rispetto al controllo in particolare nei gruppi TRT2 e BMD (-0.16 entrambi) seguiti dai gruppi TRT1 e AMP (-0.11 entrambi).

Mortalità, lesioni intestinali ed eliminazione fecale di Eimeria

In Tabella 2 sono presentati i risultati della mortalità, delle lesioni intestinali e dell'eliminazione fecale di *Eimeria*. Tutti i trattamenti hanno ridotto

significativamente la mortalità totale rispetto al controllo ($P < 0.0001$), mentre il tasso di mortalità da enterite necrotica è stato ridotto soprattutto da TRT2, TRT1 e BMD ma solo parzialmente da AMP ($P < 0.0001$). Rispetto al gruppo CTR, le lesioni intestinali da enterite necrotica sono state ridotte in particolare nei gruppi AMP e TRT2, mentre i gruppi BMD e TRT1 hanno mostrato valori intermedi ($P = 0.003$). Per quanto riguarda l'eliminazione di *Eimeria* nelle feci, non sono state rilevate oocisti di *E. acervulina* ed *E. tenella* in nessun campione. I livelli di *E. maxima* sono stati ridotti significativamente rispetto al controllo soltanto nel gruppo TRT2 ($P < 0.01$).

DISCUSSIONE

Questo studio si prefiggeva l'obiettivo di valutare l'effetto di miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti a confronto con trattamenti farmacologici convenzionali *in vivo* in un modello di enterite necrotica. Al fine di riprodurre una condizione tipica della realtà di campo caratterizzata da coccidiosi come fattore predisponente la proliferazione di *C. perfringens*, gli animali sono stati sottoposti a vaccinazione per coccidiosi con un vaccino multi-specie (Coccivac®-B52) al giorno 0, successivamente infettati con una singola dose di *E. maxima* al giorno 14 e infine sottoposti ad infezione *C. perfringens* per 3 giorni consecutivi 19, 20 e 21. È stato utilizzato un ceppo di campo di *C. perfringens* di tipo G (alpha toxin e netB toxin positivo) ossia uno dei tossino-tipi di *C. perfringens*, assieme al tipo A e al tipo C, maggiormente di interesse per l'industria avicola in quanto associati alle principali patologie enteriche (Abd El-Hack et al., 2022). Tutti gli animali in prova sono stati sottoposti al challenge in modo da simulare un focolaio di enterite necrotica attorno alla seconda-terza settimana di crescita e valutare l'eventuale effetto protettivo di trattamenti alimentari somministrati in continuo nella dieta dall'inizio alla fine del ciclo. Come trattamenti farmacologici convenzionali sono stati testati Bacitracina e Amprolium, ossia rispettivamente un antibiotico anti-clostridico e un chimico anti-coccidico. Tutti i trattamenti alimentari, sia i farmaci sia i prodotti incapsulati a base di sostanze aromatizzanti e acidi organici, hanno permesso di migliorare le performance di crescita rispetto al controllo in particolare durante il challenge e nel periodo immediatamente successivo al challenge. Questo effetto protettivo sulla crescita degli animali è stato mantenuto anche alla fine della prova al giorno 42 e complessivamente durante tutto il ciclo, quando i migliori valori di indice di conversione sono stati osservati con la combinazione di prodotti incapsulati in modo analogo a Bacitracina. Questo risultato macroscopico può essere spiegato dall'azione benefica dei trattamenti a livello intestinale, come indicato dalle ridotte lesioni intestinali da *C. perfringens* e dalla conseguente ridotta mortalità da enterite necrotica. Inoltre, i prodotti incapsulati, in particolare la loro combinazione, sono stati gli unici a ridurre anche l'eliminazione fecale di *E. maxima*, a conferma dell'azione anticoccidica di queste miscele vegetali già dimostrata in precedenti studi *in vitro* e *in vivo* (Felici et al., 2020, Tugnoli et al., 2021).

CONCLUSIONI

Questo studio ha dimostrato che in un modello di enterite necrotica di polli da carne causata da *Eimeria* e *Clostridium perfringens* l'integrazione alimentare

con miscele microincapsulate di sostanze aromatizzanti e acidi organici può migliorare le performance di crescita e ridurre le lesioni intestinali in modo analogo a trattamenti farmacologici convenzionali.

BIBLIOGRAFIA

1. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Elbestawy AR, El-Shall NA, Saad AM, Salem HM, El-Tahan AM, Khafaga F, Taha AE, AbuQamar SF and KA El-Tarabily. (2022). Necrotic enteritis in broiler chickens: disease characteristics and prevention using organic antibiotic alternatives – a comprehensive review. *Poult Sci.* 101: 101590.
2. Felici M, Tugnoli B, Ghiselli F, Massi P, Tosi G, Fiorentini L, Piva A and E Grilli. (2020). Attività anticoccidica in vitro di estratti vegetali. V Simposio Scientifico Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA), Novembre 19, 2020 – virtuale.
3. Felici M, Tugnoli B, Piva A and E Grilli. (2021). In Vitro Assessment of Anticoccidials: Methods and Molecules. *Animals* 11: 1962-1981.
4. Giovagnoni G, Tugnoli B, Piva A and E. Grilli (2019). Organic Acids and Nature Identical Compounds Can Increase the Activity of Conventional Antibiotics Against *Clostridium Perfringens* and *Enterococcus Cecorum* In Vitro. *J Appl Poult Res.* 28: 1398-407.
5. Hofacre CL, Froyman R, Gautrias B, Georgie B, Goodwin MA, and J Brown. (1998). Use of Aviguard and other intestinal bioproducts in experimental *Clostridium perfringens*-associated necrotizing enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.* 42: 579-584.
6. Quiroz-Castaneda RE and E Dantan-Gonzalez. (2015). Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. *BioMed Research International* Volume 2015, Article ID 430610, 11 pages.
7. Rossi B, Toschi A, Piva A and E. Grilli. (2020). Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutr Res Rev.* 10: 1-17.
8. Timbermont L, Haesebrouck F, Ducatelle R and F Van Immerseel. (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol.* 40(4): 341-347.
9. Tugnoli B, Piva A and E Grilli. (2021). Una miscela microincapsulata di molecole vegetali in un modello di coccidiosi in polli da carne. VI Simposio Scientifico Società Italiana di Patologia Aviaria (SIPA), Novembre 19, 2021 – Bologna, Italy.
10. Van Immerseel F, de Buck J, Pasmans F, Huyghebaert G, Haesebrouck F and R Ducatelle. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 33: 537-549.
11. Van Immerseel F, Lhys U, Pedersen K and JF Prescott. (2016). Editorial: Recent breakthroughs have unveiled the many knowledge gaps in *Clostridium perfringens*-associated necrotic enteritis in chickens: The First International Conference on Necrotic Enteritis in Poultry. *Avian Pathol.* 45: 269-270.

Tabella 1 - Performance di crescita

	Gruppo CTR	Gruppo AMP	Gruppo BMD	Gruppo TRT1	Gruppo TRT2	P
Fase: giorno 0-14						
Ingestione di alimento (kg/box)	15.60	16.82	16.13	15.79	16.02	0.15
Incremento ponderale (kg/capo)	0.275	0.302	0.289	0.284	0.283	0.19
ICA*	1.143	1.127	1.134	1.132	1.137	0.93
Fase: giorno 14-28						
Ingestione di alimento (kg/box)	66.01	68.30	64.33	66.27	66.53	0.25
Incremento ponderale (kg/capo)	0.864 ^a	0.955 ^b	0.954 ^b	0.957 ^b	0.965 ^b	0.002
ICA*	1.637 ^a	1.545 ^b	1.451 ^c	1.472 ^c	1.457 ^c	<0.0001
Fase: giorno 28-36						
Ingestione di alimento (kg/box)	63.53	61.82	62.54	62.77	62.90	0.82
Incremento ponderale (kg/capo)	0.574	0.571	0.609	0.569	0.590	0.73
ICA*	2.582	2.452	2.287	2.348	2.340	0.10
Fase: giorno 36-42						
Ingestione di alimento (kg/box)	46.42	45.40	45.47	46.28	48.64	0.13
Incremento ponderale (kg/capo)	0.592	0.558	0.554	0.543	0.597	0.42
ICA*	1.819	1.816	1.813	1.892	1.782	0.41
Totale: giorno 0-42						
Ingestione di alimento (kg/box)	191.56	192.33	188.46	191.10	194.08	0.69
Incremento ponderale (kg/capo)	2.305	2.386	2.407	2.351	2.434	0.17
ICA*	1.843 ^a	1.729 ^b	1.679 ^b	1.732 ^b	1.679 ^b	<0.0001

CTR = dieta standard; AMP = dieta standard + Amprolium a 100 ppm; BMD = dieta standard + Bacitracina a 55 ppm; TRT1 = dieta standard + Prototipo 1 a 400 g/ton; TRT2 = dieta standard + Prototipo 1 a 400 g/ton + Prototipo 2 a 500 g/ton.

* Indice di Conversione Alimentare, aggiustato sulla base della mortalità.

^{abc} Per ciascun parametro lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

Tabella 2 – Mortalità, lesioni intestinali ed eliminazione fecale di *Eimeria*

	Gruppo CTR	Gruppo AMP	Gruppo BMD	Gruppo TRT1	Gruppo TRT2	P
Mortalità						
totale (%)	7.45 ^a	4.26 ^b	3.64 ^b	3.41 ^b	1.91 ^b	<0.0001
da enterite necrotica (%)	3.6 ^a	1.6 ^{ab}	0.2 ^{bc}	0.4 ^{bc}	0 ^c	<0.0001
Lesioni enterite necrotica (*)	0.63 ^a	0.13 ^b	0.33 ^{ab}	0.30 ^{ab}	0.27 ^b	0.003
Oocisti per grammo (OPG) di feci						
<i>E. acervulina</i>	0	0	0	0	0	-
<i>E. maxima</i>	13755 ^a	10083 ^a	18995 ^a	6459 ^{ab}	4221 ^b	0.0004
<i>E. tenella</i>	0	0	0	0	0	-

CTR = dieta standard; AMP = dieta standard + Amprolium a 100 ppm; BMD = dieta standard + Bacitracina a 55 ppm; TRT1 = dieta standard + Prototipo 1 a 400 g/ton; TRT2 = dieta standard + Prototipo 1 a 400 g/ton + Prototipo 2 a 500 g/ton.

^{abc} Per ciascun parametro lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

* Score lesioni da 0 a 3 (punteggio 0 per intestino normale, 1 per intestino con perdita di tono e lieve strato di muco, 2 per intestino con severa enterite necrotizzante e 3 per intestino con estrema enterite necrotizzante e presenza di sangue nel lume).