

ATTIVITÀ ANTICOCCIDICA IN VITRO DI ESTRATTI VEGETALI

Felici M.¹, Tugnoli B.², Ghiselli F.¹, Massi P.³, Tosi G.³, Fiorentini L.³, Piva A.^{1,2}, Grilli E.^{1,4}

¹ DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 – 40064 – Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;

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

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede territoriale di Forlì, Forlì (FC), Italia;

⁴ Vetagro, Inc., 230 S. Clark St., # 320, 60604 Chicago (IL), USA;

Summary

The anticoccidial activity of thymol, carvacrol, saponins and garlic oil was assessed in an in vitro model of coccidiosis. *Eimeria* spp. sporozoites were collected from field samples, characterized and used for 3 different invasion assays on Madin-Darby Bovine Kidney cells (MDBK). The cells were challenged with 5×10^4 sporozoites without (control) or with various treatments: saponins (10 ppm), thymol and carvacrol (7 ppm each), a combination of saponins, thymol, and carvacrol at 2 doses; MIX 1 (saponins 5 ppm, thymol 3.5 ppm and carvacrol 3.5 ppm), MIX 2 (saponins 10 ppm, thymol 7 ppm and carvacrol 7 ppm). Garlic oil was tested at two concentrations: 10 ppm and 100 ppm. The treated cells were incubated at 37°C for 24 hours (invasion assay 1 and 3) and for 2, 24, and 48 hours (invasion assay 2). The efficiency of invasion was determined by counting the sporozoites left in the supernatant that were not able to invade the cells, while intracellular *Eimeria* DNA was detected by qPCR to confirm the data. Data were analyzed with ANOVA and differences were considered significant when p-value was ≤ 0.05 . Data from invasion assay 1 showed that the thymol and carvacrol-containing blends significantly reduced invasion, especially in combination with saponins at the highest dose. Saponins alone did not have a strong inhibiting activity but acted synergistically with the other molecules. Interestingly, in invasion assay 2 it was found that the effect of the highest dose of the blend of saponins, thymol and carvacrol was already visible at 2 hours post infection, while the other treatments were significantly successful at 24 hours post infection. Data from invasion assay 3 proved the inhibiting power of garlic oil at the lowest dose, while the highest one was cytotoxic for MDBK cells too. The invasion assay protocol was designed to screen molecules *in vitro* starting from field fecal samples and it can represent a potential tool in *Eimeria* research. Moreover, this study shows that invasion in MDBK cells by *Eimeria* sporozoites is inhibited in presence of thymol, carvacrol, saponins and garlic oil, thus highlighting the anticoccidial potential of these compounds.

INTRODUZIONE

I coccidi del genere *Eimeria* sono importanti parassiti aviari che causano gravi enteriti, con conseguenti perdite economiche nel settore avicolo, stimate a oltre 3 miliardi di dollari all'anno (Cobaxin-Cardenas, 2018). Le specie di *Eimeria* principalmente coinvolte nell'insorgenza della malattia sono cinque: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix* ed *E. tenella*, con le ultime tre associate al più alto tasso di

mortalità e maggior parte dei sintomi, mentre le altre comportano manifestazioni subcliniche, che sono spesso più difficili da riconoscere (Quiroz-Castañeda & Dantán-González, 2015). Inoltre, i coccidi possono contribuire all'insorgenza di infezioni secondarie, come la clostridiosi, fattore scatenante di gravi enteriti necrotiche (Moore, 2016). Le strategie di controllo della malattia includono l'uso di ionofori e farmaci anticoccidici sintetici applicati con programmi di rotazione o vaccinazione con oocisti di *Eimeria* vive. Tuttavia, i vaccini possono innescare reazioni indesiderate che influenzano le prestazioni di crescita e soprattutto, di recente, sono stati documentati molti casi di resistenza ai farmaci anticoccidici (Abbas, Colwell, & Gilleard, 2012). Di conseguenza, la ricerca si sta ora concentrando sullo studio di nuove alternative per controllare questi agenti patogeni (Peek H.W., 2011). I prodotti di origine botanica sono ben noti per la loro attività antimicrobica e antiparassitaria, quindi possono rappresentare uno strumento prezioso contro *Eimeria* (Cobaxin-Cardenas, 2018). I meccanismi di azione antimicrobico di queste molecole comprendono la degradazione della parete cellulare, il danneggiamento del citoplasma, la perdita di ioni con riduzione del gradiente protonico e anche l'induzione dello stress ossidativo, che portano all'inibizione dell'invasione e dello sviluppo intracellulare delle specie di *Eimeria* (Abbas et al., 2012; Nazzaro, Fratianni, de Martino, & Coppola, 2013). Questi composti sono spesso testati *in vivo*, ma le problematiche etiche per il benessere degli animali e gli alti costi di sperimentazione stanno spingendo verso lo sviluppo di nuovi metodi *in vitro* per test di screening (Singh et al., 2016). Tra i composti di origine botanica, timolo, carvacolo e le saponine sono molecole promettenti perché possono interferire con la permeabilità della membrana dei patogeni, causando una cascata di reazioni che coinvolgono l'intera cellula causandone la morte (Nazzaro et al., 2013). Questi composti si trovano naturalmente in diverse piante: timolo e carvacolo sono i principali componenti di origano, timo e basilico (Sakkas & Papadopoulou, 2017), mentre le specie del genere *Quillaja* e *Yucca* sono fonti comuni di saponine, glicosidi anfipatici con funzione di difesa (Francis, Kerem, Makkar, & Becker, 2002). Anche l'aglio e il suo olio essenziale sono da tempo noti come potenti composti antimicrobici, antiparassitari e antiinfiammatori, e di recente ne sono stati anche documentati effetti benefici sul benessere animale in seguito a challenge *in vivo* con oocisti di *Eimeria* (Ali, Chand, Ullah Khan, Naz, & Gul, 2019). Lo scopo di questo studio è valutare l'effetto antiparassitario di diverse miscele di timolo, carvacolo, saponine e olio di aglio sull'efficienza di infestazione degli sporozoitidi di *Eimeria in vitro*. Il protocollo è stato messo a punto in modo da testare presunti composti anticoccidici su campioni di campo, rispettando così il benessere degli animali e evitando il loro sacrificio, come descritto dalle linee guida delle "3Rs" (Russel, W.M.S and Burch, 1959).

MATERIALI E METODI

Recupero di sporozoitidi da campioni di campo

Le oocisti di *Eimeria* spp. sono state raccolte da campioni fecali di animali non vaccinati e sintomatici. I campioni sono stati processati come indicato in "Guidelines on techniques in coccidiosis research" (Shirley, 1995), con alcune modifiche. Le oocisti sono state risospese in bicromato di potassio al 2% (Cat. # P5271, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), per consentire la sporulazione. I campioni sono stati quindi puliti con Dulbecco's phosphate buffer saline (DPBS) (Cat. # D8537, Sigma-Aldri-

ch, St. Louis, Missouri, USA) e risospesi in buffer di lisi T1 (Cat. # 740952.240C, MACHEREY-NAGEL Inc., Betlemme, USA) e conservati a -80 ° C fino all'analisi qPCR, eseguita come descritto di seguito. Dopo la sporulazione, le oocisti sono state lavate e risospese in ipoclorito di sodio per la sterilizzazione, quindi sono state nuovamente lavate e lisate con biglie di vetro (0,5 mm) per 1 minuto con Disruptor Genie (Cat. # SI-D258, Scientific Industries, Bohemia, New York, USA) per liberare le sporocisti. In seguito, queste sono state lavate e risospese in terreno di excistazione, contenente 2,5 g/L di tripsina (N. cat. T4049, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 5 g/L di sali biliari (Cat. # B3301, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 2 g/L pancreatina (Cat. # P1750, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e 2 g/L MgCl₂ (Cat. # 459337, Carlo Erba Reagents, Milano, Italia). La sospensione è stata incubata per 90 minuti a 39 ° C. Successivamente, gli sporozoitii ottenuti sono stati lavati e risospesi nel mezzo cellulare per iniziare il test di infestazione.

Colture cellulari

Cellule Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK, Cat. # CCL-22, ATCC, Manassas, Virginia, USA) sono state seminate (1 x 10⁵ cellule / pozzetto) su piastre da 24 pozzetti (Cat. # 353047, Corning Incorporated, Corning, New York, USA) e cresciute fino a confluenza per 48 ore in terreno Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (N. cat. D1145, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), siero fetale bovino (FBS) al 10% (N. cat. F7524, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 1x Penicillina-Streptomicina (Cat. # P4333, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e L-glutammina 10 mM (Cat. # G7513, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Le cellule sono state incubate a 37 ° C, 5% CO₂ e 95% aria.

Saggio di infestazione I

Una volta a confluenza, le cellule sono state infettate con 5 x 10⁴ sporozoitii per pozzetto e trattate con uno dei trattamenti a base di timolo (Cat. # T0501, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), carvacrolo (Cat. # W224511, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e saponine (Vetagro S.p.A., Reggio Emilia, Italia). I gruppi di trattamento erano: controllo negativo (senza sporozoitii e nessun trattamento), controllo infetto (C +), saponine 10 ppm (SAP), timolo e carvacrolo (7 ppm ciascuno) (THY: CAR), saponine 5 ppm + timolo 3.5 ppm + carvacrolo 3,5 ppm (MIX1) o saponine 10 ppm + timolo 7 ppm + carvacrolo 7 ppm (MIX2). L'efficacia dei trattamenti è stata studiata 24 ore dopo l'infezione (hpi). Dopo il test di infestazione, le cellule sono state colorate con tecnica Giemsa al fine di osservare l'effettiva internalizzazione degli sporozoitii trattati. Inoltre, le cellule sono state accuratamente lavate con DPBS fino alla rimozione della maggior parte dei detriti residui. Quindi le cellule sono state staccate con tripsina allo 0,25%, lavate con DPBS, risospese nel buffer di lisi T1 e conservate a -80 ° C fino all'analisi. Per misurare l'efficienza dell'infestazione, gli sporozoitii rimasti nel surnatante di 18 pozzi per gruppo (n = 18) sono stati contati su 4 quadrati di una camera di Burker al microscopio invertito (Nikon Eclipse TS100, Nikon corporation, Tokyo, Japan) e il numero risultante è stato usato per stimare l'efficienza di invasione con la seguente formula:

$$100 - \left[\left(\frac{\text{numero di sporozoitii nel surnatante dopo il trattamento}}{\text{numero di sporozoitii iniziali}} \right) \times 100 \right]$$

Saggio di infestazione 2

Una volta a confluenza, le cellule sono state infettate con 5×10^4 sporozoi per pozzetto e trattate con uno dei trattamenti descritti nel saggio precedente. L'efficienza di infestazione è stata stimata tramite conte degli sporozoi nel surnatante di 12 pozzetti per trattamento (n=12) a tre timepoints (2 hpi, 24 hpi e 48 hpi).

Saggio di infestazione 3

Una volta a confluenza, le cellule sono state infettate con 5×10^4 sporozoi per pozzetto e trattate con diverse concentrazioni di olio di aglio. I gruppi trattamento erano: controllo negativo (senza sporozoi e nessun trattamento), controllo infetto (C +), olio di aglio 10 ppm (GO10) e olio di aglio 100 ppm (GO100). L'efficienza di infestazione è stata stimata tramite conte degli sporozoi nel surnatante dopo 24 hpi di 6 pozzetti per trattamento (n=6).

Estrazione del DNA e qPCR

L'estrazione del DNA e la qPCR sono state eseguite per caratterizzare i campioni di oocisti e per rilevare il DNA di *Eimeria* spp. nelle cellule raccolte dopo i saggi. Il kit di estrazione del DNA NucleoSpin (Cat. N. 740952.240C, MACHEREY-NA-GEL Inc., Bethlehem, USA) è stato utilizzato seguendo le istruzioni del produttore. La concentrazione del DNA è stata misurata usando un Denovix DS-11 Series Spectrophotometer/Fluorometer (modalità microvolume con tecnologia Smart Path - Cat. # DS11, Denovix, Hanby Building, Wilmington, USA) a 260 nm e la qualità è stata verificata con il rapporto 260/280. La reazione di PCR è stata preparata in un volume finale di 10 μ L, inclusi 5 μ L di iTaq™ Universal SYBR Green Supermix (Cat. # 1725120, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA), 500 nM di primer forward e reverse e 2 μ L di DNA e la mix è stata analizzata con CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Cat. n. 1855195, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). I primer utilizzati per rilevare *Eimeria* spp. sono stati forniti da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) e sono stati disegnati in modo da amplificare la regione specie-specifica ITS-1. Il ciclo di reazione utilizzato comprende 3 minuti a 95° C, 40 cicli di 10 secondi a 95° C e 30 secondi a 60° C. La formazione di prodotti non specifici è stata monitorata con un'analisi della temperatura di melting. Il ciclo di melting includeva incrementi di 0,5° C da 55 a 95° C per 5 secondi. Un metodo di quantificazione relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) è stato usato per verificare l'efficacia dell'infestazione, usando come reference il gene del citocromo B bovino (CYTB) (Livak & Schmittgen, 2001).

Analisi statistica

Il software Graphpad Prism 8.1.1 è stato utilizzato per eseguire analisi statistiche. È stata effettuata un'analisi descrittiva dei dati e la normalità è stata verificata con il test di Shapiro-Wilk. I dati normalmente distribuiti sono stati analizzati con un test parametrico one-way ANOVA o test T di Student, mentre i dati non normalmente distribuiti sono stati analizzati con i test di Kruskal Wallis. Per il saggio di infestazione a timepoints, il confronto è stato effettuato con un two-way ANOVA. Il post-hoc multiple comparison è stato effettuato con il test di Tukey e le differenze sono state considerate significative quando il valore p era $\leq 0,05$.

RISULTATI

I campioni di campo sono stati caratterizzati con qPCR per rilevare le specie di *Eimeria* all'interno. Sono state rilevate le specie *E. tenella*, *brunetti* e *acervulina*. Quindi, l'effettiva capacità di invasione degli sporozoitii è stata visualizzata mediante colorazione di Giemsa (Fig. 1). Dalle conte degli sporozoitii rimasti nel surnatante del primo test di infestazione è stata evidenziata una riduzione significativa delle efficienze di infestazione tra tutti i trattamenti a base di timolo e carvacrolo ($p \leq 0,0002$) rispetto al C +, in particolare THY: CAR e MIX2, mentre con le saponine l'effetto non è stato significativo ($p = 0,409$) (Fig. 2). I risultati di qPCR hanno confermato le conte, poiché era visibile lo stesso trend di inibizione THY: CAR e MIX2 hanno ridotto significativamente la quantità di DNA di *Eimeria tenella* all'interno delle cellule rispetto a C + (i valori p sono rispettivamente 0,022 e $<0,0001$), mentre SAP e MIX1 non differivano da esso. Il DNA di altre specie di *Eimeria* non è stato rilevato all'interno delle cellule (Fig. 3). Nel secondo saggio di invasione, i conteggi del surnatante sono stati effettuati a timepoints. La tendenza all'inibizione era visibile a 2 hpi: SAP e MIX1 non differivano da C +, mentre THY: CAR e MIX2 erano significativamente ridotti rispetto a C + ($p = 0,003$ e $0,001$, rispettivamente). A 24 hpi, l'efficienza di invasione di THY: CAR e MIX2 era significativamente inferiore a C + ($p < 0,0001$); a 48 hpi, tutti i trattamenti hanno ridotto l'efficienza di invasione rispetto a C + ($p < 0,05$). Inoltre, mentre tutti i trattamenti mostravano un aumento dell'infestazione fino a raggiungere un plateau entro le prime 24 hpi, il trattamento MIX2 inibiva definitivamente l'infestazione già nelle prime due ore (Fig. 4). Dalle conte del terzo saggio di infestazione è emersa una diminuzione significativa dell'efficienza di infestazione per il gruppo GO10 ($p < 0,0001$) mentre la dose maggiore (GO100) era citotossica per il monostrato cellulare, perciò è stata esclusa dall'analisi (Fig. 5). L'analisi qPCR ha confermato la diminuzione dell'infestazione con il trattamento GO10 rispetto al C+ ($p = 0,002$) (Fig. 6).

Fig. 1: Sporozoitii internalizzati in cellule MDBK colorate con tecnica Giemsa. Le frecce indicano gli sporozoitii intracellulari dopo 24 ore di infestazione.

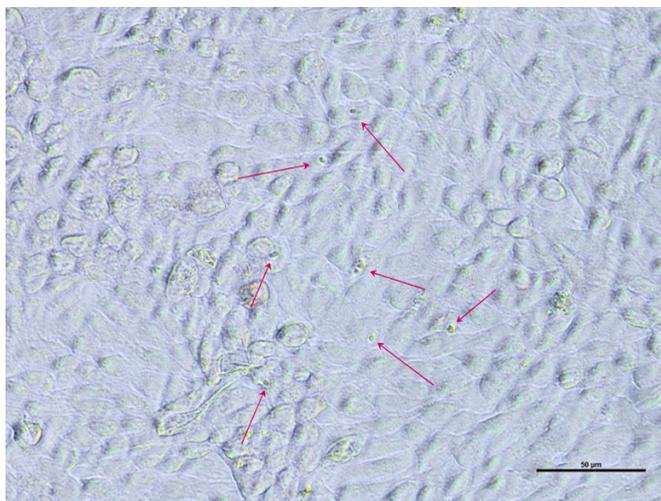


Fig. 2: Efficienza di infestazione determinata con conte dei surnatanti nel saggio di infestazione 1. I valori percentuali sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=18). L'analisi statistica è stata effettuata con one-way ANOVA, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P £ 0,05).

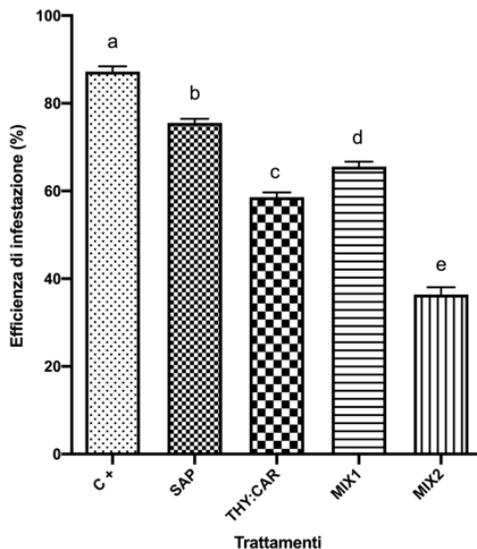


Fig. 3: Quantità relativa di DNA intracellulare di *E. tenella* del saggio di infestazione 1. I valori $2^{-(\Delta\Delta C^t)}$ sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=6). L'analisi statistica è stata effettuata con one-way ANOVA, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P £ 0,05).

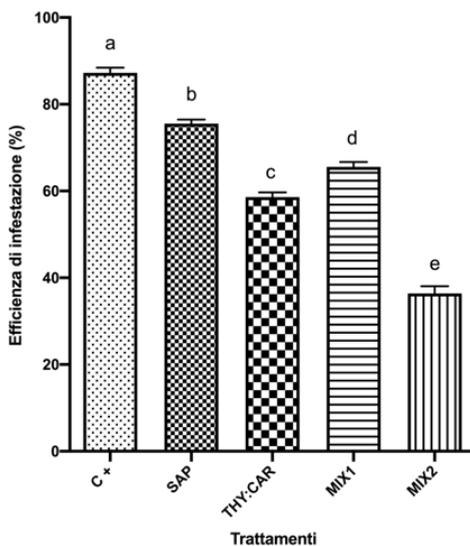


Fig. 4: Efficienza di infestazione determinata con conte dei surnatanti del saggio di infestazione 2. I valori percentuali sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=12). L'analisi statistica è stata effettuata con two-way ANOVA, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti all'interno dello stesso timepoint (P £ 0,05).

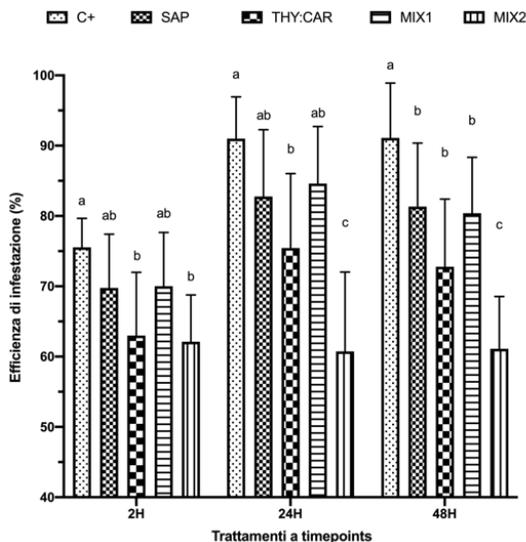


Fig. 5: Efficienza di infestazione determinata con conte dei surnatanti del saggio di infestazione 3. I valori percentuali sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=6). L'analisi statistica è stata effettuata con test T di Student, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P £ 0,05).

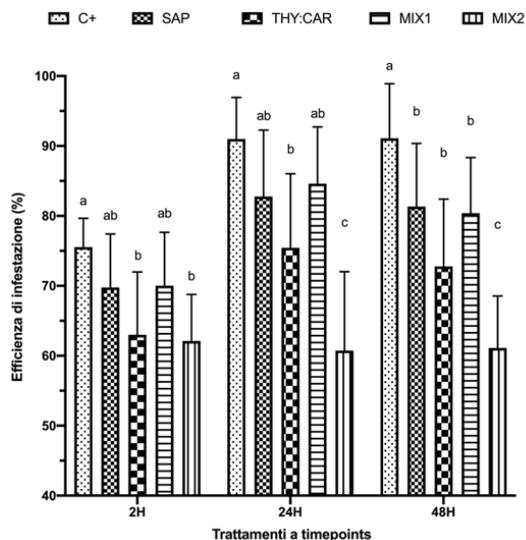
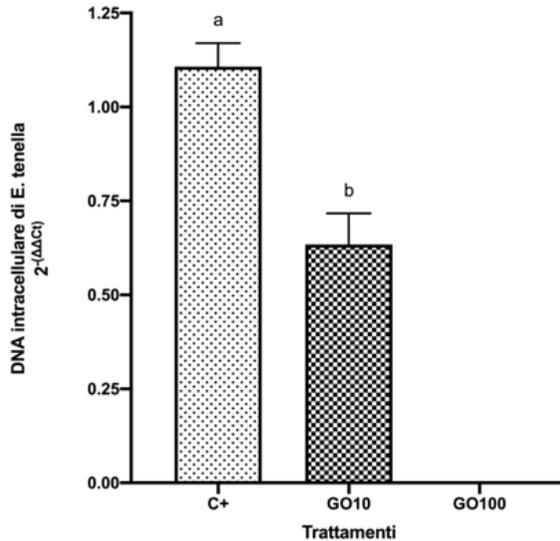


Fig. 6: Quantità relativa di DNA intracellulare di *E. tenella* del saggio di infestazione 3. I valori $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ sono presentati come media e i valori di SEM sono simbolizzati con una barra (n=6). L'analisi statistica è stata effettuata con test T di Student, le lettere sopra le colonne rappresentano le differenze statisticamente significative tra i trattamenti (P £ 0,05).



DISCUSSIONE

I recenti casi di resistenza ai classici trattamenti anticoccidici e le restrizioni all'uso di antibiotici negli allevamenti hanno aumentato la necessità di effettuare screening su nuovi composti per controllare la diffusione delle specie di *Eimeria* (Giannenas et al., 2003). Gli studi *in vivo* rappresentano uno strumento di routine, ma costi elevati e questioni etiche stanno spingendo verso la valutazione di nuovi metodi per lo screening di sostanze *in vitro* (Thabet, Zhang, Alnassan, Dausgchies, & Bangoura, 2017). Lo scopo di questo studio era replicare un modello di infestazione *in vitro* per *Eimeria* con un metodo adatto per stimare l'efficienza di infestazione su cellule MDBK e utilizzarlo per testare molecole botaniche.

Per prima cosa, gli sporozoi sono stati estratti da campioni fecali di campo multi-specie, i quali sono una valida fonte per esperimenti *in vitro* perché sono più rappresentativi della malattia; infatti, sul campo, i casi di coccidiosi sono solitamente caratterizzati da più specie di *Eimeria*. Nonostante ciò, solo il DNA di *E. tenella* è stato rilevato all'interno delle cellule, suggerendo che potrebbe esserci uno specifico meccanismo di internalizzazione; infatti, ci sono poche prove gli sporozoi di altre specie possano essere internalizzati da MDBK e questo aspetto dovrebbe essere ulteriormente studiato (Alnassan, Thabet, Dausgchies, & Bangoura, 2015; Burt, Tersteeg-Zijderveld, Jongerius-Gortemaker, Vervelde, & Vernooij, 2013; Jitviriyanon et al., 2016). Nel pollo, il bersaglio naturale delle *Eimerie* è l'epitelio intestinale, ma non è ancora disponibile un modello di cellule epiteliali intestinali specifico dell'o-

spite. Altre linee cellulari sono state usate per studiare *Eimeria*, ma alcune sono più permissive di altre (Augustine, 2001a). Tierney e Mulcahy (2003) hanno dimostrato che gli sporozoi di *E. tenella* possono essere internalizzati da diversi modelli cellulari, in particolare cellule renali di criceto, MDBK e cellule renali di coniglio, con differenti efficienze (Tierney & Mulcahy, 2003). In un altro studio, Augustine (2001) ha dimostrato che diverse specie di *Eimeria* differivano nella loro capacità di invadere le cellule, a causa di fattori dipendenti sia dagli sporozoi che dal monostato cellulare (Augustine, 2001b). In realtà, sembra che l'invasione avvenga mediante il riconoscimento di molecole ricettive; nel nostro studio è possibile che le condizioni abbiano consentito solo a *E. tenella* di invadere con successo le cellule.

Per stimare l'efficienza dell'invasione, sono stati conteggiati gli sporozoi nei surnatanti ed è stata effettuata l'analisi qPCR. Entrambi questi metodi sono economici, veloci e affidabili. Studi precedenti applicavano diversi metodi di quantificazione, ma la maggior parte di questi si basa sull'uso di reagenti costosi e pericolosi come anticorpi o composti radioattivi. La qPCR è stata anche utilizzata da Alnassan et al. (2015) e Thabet et al. (2017) per quantificare *E. tenella* in MDBK, ma essi hanno invece applicato un metodo di quantificazione assoluta, utilizzando il gene ITS-1 di *E. tenella* inserito in un plasmide pSCA-amp / kan (Alnassan et al., 2015; Thabet et al., 2017).

Nel presente studio, il citocromo B bovino è stato utilizzato come gene housekeeping per rilevare e normalizzare la quantità di DNA di *Eimeria* nelle cellule invase, applicando così un metodo di quantificazione relativo. Il conteggio degli sporozoi nel surnatante rappresenta un nuovo metodo di quantificazione e non siamo a conoscenza di altri studi in cui è stato utilizzato. Questo si è rivelato uno strumento robusto e preciso e in grado di fornire una rapida stima dell'efficienza di infestazione. Tuttavia, confrontando i risultati ottenuti con qPCR e conteggio degli sporozoi, sono emerse alcune divergenze; anche se la tendenza all'inibizione è mantenuta per tutti i trattamenti, i valori erano abbastanza diversi tra i due metodi. Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che per i conteggi, la percentuale di inibizione è calcolata in relazione a tutti gli sporozoi liberi, che sono di varie specie, mentre nel caso di qPCR, è calcolata sul DNA di una sola specie di *Eimeria* (in questo caso era solo *E. tenella*). Questo è probabilmente il motivo per cui i due metodi non potevano essere completamente confrontabili, quindi i conteggi degli sporozoi sono stati scelti come miglior marcatore per questo studio.

Tra i trattamenti testati, le miscele a base di timolo e carvacolo si sono rivelate le più efficaci. Anche altri studi hanno dimostrato che timolo e carvacolo esercitano un'attività antiparassitaria su *Eimeria* e il loro meccanismo d'azione è legato alla distruzione della membrana degli sporozoi e alla conseguente perdita di ioni calcio dal parassita, essenziale per il processo di invasione cellulare (Bozkurt, Giannenas, Küçükyilmaz, Paneri, & P-Florou, 2013; Sárközi et al., 2007) ortho-vanillin, meta-anisaldehyde. Studi sulle saponine rivelano che questi composti possono interagire con il colesterolo sulla membrana degli sporozoi, ostacolando così il ciclo di vita di *Eimeria* (Bozkurt et al., 2013). Nel presente studio, i risultati suggeriscono che timolo e carvacolo esercitano il principale effetto inibitore sugli sporozoi e le saponine agiscono come adiuvanti, ma non hanno di per sé una forte azione inibitrice. Le saponine potrebbero invece facilitare l'attività del timolo e del carvacolo sugli sporozoi. In effetti, i dati del secondo saggio di invasione evidenziano che gli

sporozoiti impiegano 24 ore per completare il processo di invasione. L'azione di timolo, carvacrolo e saponine era invece già visibile a 2 hpi nei gruppi THY: CAR e MIX2. Tuttavia, solo MIX2 è riuscita a fermare l'infestazione a 2 hpi, mentre in tutti gli altri trattamenti il processo è durato più a lungo. Ciò suggerisce che le saponine potrebbero aumentare il potere anticoccidico del timolo e del carvacrolo consentendo un'azione molto rapida di questi composti.

L'attività del timolo e del carvacrolo contro *Eimeria* è stata precedentemente discussa da Giannenas et al. (2003) e Küçükyılmaz et al. (2012) in prove *in vivo*. Entrambi hanno scoperto che gli oli essenziali di origano, ricchi di timolo e carvacrolo, contribuiscono a migliorare la salute degli animali durante un challenge con coccidi e a ridurre il numero di oocisti escrete nelle feci. Nello studio di Giannenas et al. è stato rilevato un aumento del peso corporeo simile al gruppo non infetto nei polli trattati con oli essenziali, nello studio di Küçükyılmaz et al. è stato anche riscontrato un miglioramento della risposta immunitaria. Burt et al. ha analizzato l'effetto di miscele contenenti carvacrolo su MDBK *in vitro* e ha riscontrato che il carvacrolo inibiva in modo significativo l'invasione di MDBK da parte di *E. tenella*. In questi studi, la composizione delle miscele era variabile e sono stati utilizzati metodi di rilevamento differenti; è quindi difficile confrontare i risultati (Burt et al., 2013; Giannenas et al., 2003; Küçükyılmaz et al., 2012). Ad ogni modo, l'efficacia anticoccidica di queste molecole è stata ulteriormente confermata dai risultati di questo studio.

In questo studio è stata valutata anche l'efficacia anticoccidica dell'olio di aglio. Dai risultati si evince che anche questo composto ha un effetto importante sugli sporozoiti, ma ad alte concentrazioni è citotossico per il monostrato cellulare. Altri studi sono stati condotti su composti dell'olio d'aglio, come l'allicina, ed è stato confermato il forte effetto antiparassitario (Alnassan et al., 2015). Il meccanismo d'azione dell'allicina deve essere ancora compreso in dettaglio, ma sembra essere collegato all'inibizione di enzimi contenenti cisteina, grazie alla presenza di un gruppo solfossido nella struttura dell'allicina (Borlinghaus, Albrecht, Gruhlke, Nwachukwu, & Slusarenko, 2014). Ciò spiega come l'attività di allicina e olio d'aglio non sia specifica per i parassiti e che la dose più alta del composto possa comportare un effetto indesiderato sulle cellule. Ulteriori studi con più concentrazioni saranno effettuati per determinare la tossicità su questa linea cellulare e sugli sporozoiti.

CONCLUSIONI

La letteratura scientifica presenta uno scarso numero di studi su *Eimeria* e quelli disponibili sono molto diversi e difficili da confrontare tra loro. Il protocollo applicato in questo studio può essere utilizzato per vagliare velocemente e con successo altri composti a varie dosi al fine di sostituire e ridurre il sacrificio degli animali impiegati in test *in vivo*. Per migliorare la ricerca in questo settore, potrebbe essere utile studiare un metodo valido e universale per gli studi *in vitro* su *Eimeria* che rispetti le linee guida "3R" e questo studio è uno dei primi a utilizzare campioni di campo in modo efficace per lo screening di sostanze *in vitro*. È stato inoltre dimostrato che le miscele di timolo e carvacrolo e olio di aglio sono interessanti per il trattamento della coccidiosi; le modalità d'azione effettive devono essere chiarite in futuro, studiando il pathway metabolico e il ciclo di vita degli sporozoiti.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, R. Z., Colwell, D. D., & Gilleard, J. (2012). Botanicals: An alternative approach for the control of avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal*, 68(2), 203–215. <https://doi.org/10.1017/S0043933912000268>
2. Ali, M., Chand, N., Ullah Khan, R., Naz, S., & Gul, S. (2019). Anticoccidial effect of garlic (*Allium sativum*) and ginger (*Zingiber officinale*) against experimentally induced coccidiosis in broiler chickens. *JOURNAL OF APPLIED ANIMAL RESEARCH*, 47, 79–84.
3. Alnassan, A. A., Thabet, A., Dauschies, A., & Bangoura, B. (2015). In vitro efficacy of allicin on chicken *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitology Research*, 114(10), 3913–3915. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4637-2>
4. Augustine, P. C. (2001a). Cell: Sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *International Journal for Parasitology*, 31(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00150-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00150-8)
5. Augustine, P. C. (2001b). Invasion of Different Cell Types by Sporozoites of *Eimeria* Species and Effects of Monoclonal Antibody 1209-C2 on Invasion of Cells by Sporozoites of Several Apicomplexan Parasites. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(2), 177–181.
6. Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C. H., Nwachukwu, I. D., & Slusarenko, A. J. (2014). Allicin: Chemistry and biological properties. *Molecules*, 19(8), 12591–12618. <https://doi.org/10.3390/molecules190812591>
7. Bozkurt, M., Giannenas, I., Küçükyılmaz, K., Paneri, E., & P-Florou, C. (2013). An update on approaches to controlling coccidia in poultry using botanical extracts. *British Poultry Science*.
8. Burt, S. A., Tersteeg-Zijderveld, M. H. G., Jongerius-Gortemaker, B. G. M., Vervelde, L., & Vernooij, J. C. M. (2013). In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. *Veterinary Parasitology*, 191(3–4), 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.001>
9. Cobaxin-Cardenas, M. E. (2018). Natural Compounds as an Alternative to Control Farm Diseases: Avian Coccidiosis. In R. E. Quiroz-Castañeda (Ed.), *Farm animal diseases, recent omic trends and new strategies of treatment* (pp. 135–149). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
10. Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88(6), 587–605. <https://doi.org/10.1079/bjn2002725>
11. Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Papazahariadou, M., Christaki, E., Botsoglou, N. A., & Spais, A. B. (2003). Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Archives of Animal Nutrition*, 57(2), 99–106. <https://doi.org/10.1080/0003942031000107299>
12. Jitviriyanon, S., Phanthong, P., Lomarat, P., Bunyapraphatsara, N., Porntrakulpipat, S., & Paraksa, N. (2016). In vitro study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 228, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.020>
13. Küçükyılmaz, K., Bozkurt, M., Selek, N., Güven, E., Eren, H., Atasever, A., ... Çinar, M. (2012). Effects of vaccination against coccidiosis, with and without a specific herbal essential oil blend, on performance, oocyst excretion and serum

- IBD titers of broilers reared on litter. *Italian Journal of Animal Science*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.4081/ijas.2012.e1>
14. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
 15. Moore, R. J. (2016). Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. *Avian Pathology*, 45(3), 275–281. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1150587>
 16. Nazzaro, F., Fratianni, F., de Martino, L., & Coppola, R. (2013). Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451–1474.
 17. Peek H.W., L. W. J. . (2011). Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccine and other prevention strategies. *Veterinary Quarterly*, 31(3), 143–161.
 18. Quiroz-Castañeda, R. E., & Dantán-González, E. (2015). Control of avian coccidiosis: Future and present natural alternatives. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/430610>
 19. Russel, W.M.S and Burch, R. . (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. In *London: Methuen*. <https://doi.org/10.1177/0162243917726579>
 20. Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 429–438. <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>
 21. Sárközi, S., Almássy, J., Lukács, B., Dobrosi, N., Nagy, G., & Jóna, I. (2007). Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 28(2–3), 167–174. <https://doi.org/10.1007/s10974-007-9113-x>
 22. Shirley, M. W. (1995). Eimeria species and strains of chickens. In *Guidelines on techniques in coccidiosis research* (pp. 1–25).
 23. Singh, V. P., Pratap, K., Sinha, J., Desiraju, K., Bahal, D., & Kukreti, R. (2016). Critical evaluation of challenges and future use of animals in experimentation for biomedical research. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(4), 551–561. <https://doi.org/10.1177/0394632016671728>
 24. Thabet, A., Zhang, R., Alnassan, A. A., Dauschies, A., & Bangoura, B. (2017). Anticoccidial efficacy testing: In vitro Eimeria tenella assays as replacement for animal experiments. *Veterinary Parasitology*, 233, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.12.005>
 25. Tierney, J., & Mulcahy, G. (2003). Comparative development of Eimeria tenella (Apicomplexa) in host cells in vitro. *Parasitology Research*, 90(4), 301–304. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0846-1>