

EFFETTI DELLE PROFILASSI ANTIMICROBICHE SUL MICROBIOTA INTESTINALE E SULLA BARRIERA INTESTINALE IN POLLI BROILER

Cuccato M.¹, Scaglione F. E.¹, Pregel P.¹, Laconi A.², Perona G.¹, Nurisso S.¹, Sereno A.¹, Divari S.¹, Piccirillo A.², Cannizzo F. T.¹

¹*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino - Largo Paolo Braccini, 2 - 10095 Grugliasco (TO).*

²*Dipartimento di Biomedicina comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova - Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD).*

Summary

The intestinal barrier is a complex system that allows the protection of the gut, preventing systemic diseases, and ensuring optimal agricultural productivity. To date, in the poultry industry, concerns have been raised about antimicrobial use and antimicrobial resistance. However, antimicrobials can play a role in the modulation of the intestinal barrier and, in particular, of the gut microbiota. Alteration of normal homeostasis of this barrier can induce arousal of an inflammatory state with intestinal symptoms and lesions. This study aimed mainly to describe the consequences of prophylactic and therapeutic antimicrobial use in modulating the intestinal barrier. The intestinal contents of the ileum and caecum were investigated by 16S rRNA gene sequencing and the intestinal tissues were analyzed using a histopathological scoring system. Our results show that the diversity metrics of microbial communities were affected by the use of antimicrobials. Furthermore, the genera *Campylobacter* spp. was particularly abundant in ileal samples, suggesting a possible risk to human public health. Histopathological evaluations showed that the treated animals presented several lesions, such as epithelial detachment, villi fusion, mucosal necrosis and the presence of lymphocytic and eosinophilic infiltrates in the mucosa and submucosa of the ileum, caecum and colon. Finally, this study suggests a possible role for antimicrobials in the modulation of the different components of the intestinal barrier, and further studies are needed to better clarify their involvement.

INTRODUZIONE

Il corretto funzionamento della barriera intestinale nel pollo da carne è di notevole importanza per garantire la crescita in salute dell'animale (Dal Pont et al., 2020). Questa complessa barriera è responsabile della difesa dell'intestino ed è composta da microbiota intestinale, enterociti e immunità mucosale (Pawłowska and Sobieszcańska, 2017; Iacob and Iacob, 2019). Disordini gastroenterici possono alterare la barriera intestinale ed avere conseguenze negative sulle performance produttive, il benessere animale e la mortalità (Dal Pont et al., 2020; Tabler et al., 2020). Inoltre, è stato recentemente chiarito che l'alterazione dell'omeostasi intestinale può attivare a cascata i *pathway* capaci di innescare uno stato infiammatorio (Dal Pont et al., 2020). Il microbiota intestinale costituisce la prima linea di difesa della barriera intestinale ed è costituito da una complessa comunità microbica, in rapporto di simbiosi con il proprio ospite (Kers et al., 2018; Iacob and Iacob, 2019; Le Roy et al., 2019). Infatti, il microbiota intestinale può influenzare diverse funzioni dell'ospite, tra cui la digestione delle sostanze nutrienti, l'immunità e il metabolismo (Xiao et al., 2017). L'impiego di sostanze antimicrobiche (AM) in allevamento può alterare la composizione del microbiota e di conseguenza influire sulla salute

intestinale (Xiong et al., 2018). In questi anni si è riscontrata crescente preoccupazione nei confronti dell'utilizzo degli AM negli allevamenti animali, a causa del preoccupante aumento nell'uomo di infezioni mediate da patogeni resistenti (Mehdi et al., 2018). Tuttavia, l'utilizzo di AM può avere conseguenze dirette sugli animali allevati e in particolare sul microbiota intestinale causando disbiosi (Yu et al., 2017; Zhang et al., 2017) e conseguente calo della risposta immunitaria e perdita della permeabilità e integrità intestinale (Jacob and Jacob, 2019). Lo scopo principale di questo studio è stato quello di valutare gli effetti di diversi protocolli di profilassi antimicrobica sul microbiota e sulla barriera intestinale dei polli broiler. A tale scopo le comunità microbiche di ileo e cieco sono state analizzate mediante la tecnica di sequenziamento *16S rRNA gene*. Gli effetti dei trattamenti sulla barriera intestinale sono stati valutati mediante istopatologia con l'ausilio di uno *scoring system*.

MATERIALI E METODI

Prova zootecnica

Nel 2019 presso l'azienda avicola del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino sono stati allevati 120 broiler (Ross 308). Gli animali sono stati acquistati da un incubatoio locale, dove hanno ricevuto la vaccinazione *in ovo* contro la malattia di Marek e di Gumboro. Inoltre, alla schiusa sono stati vaccinati contro la coccidiosi (*coarse spray*; Hypracox, Amer, Spain), la malattia di Newcastle e la bronchite infettiva (*fine spray*). I pulcini sono stati divisi in 6 gruppi al momento dell'accasamento. Ogni gruppo aveva a disposizione acqua e mangime *ad libitum*. Le condizioni di allevamento (programma luce, temperatura, umidità relativa e ventilazione) sono state controllate secondo le linee guida di allevamento del pollo da carne Ross 308. Dal giorno di accasamento al 12° giorno di allevamento gli animali sono stati alimentati con una dieta di avviamento, successivamente fino al giorno prima della macellazione (46° giorno) con una dieta di accrescimento. La dieta di accrescimento era addizionata con diclazuril, un coccidiostatico, alla concentrazione finale di 1 mg/kg. Durante il ciclo produttivo, 5 gruppi hanno ricevuto diversi protocolli di profilassi antimicrobica con amoxicillina (AMX1 e AMX2), tiamfenicolo (THP1 e THP2) e trimetoprim-sulfadiazina (TRIM). Il sesto gruppo, impiegato come controllo, non ha ricevuto alcun trattamento (K). In seguito a comparsa di sintomatologia intestinale e respiratoria, tutti gli animali sono stati trattati con doxiciclina a dose terapeutica (20 mg/kg P.V. SID) dal 33° al 37° giorno di allevamento. I diversi protocolli di trattamento applicati sono descritti in dettaglio in Tabella 1.

Tabella 1. Protocolli di profilassi antimicrobica applicati nel corso della prova zootecnica.

| Gruppo | Molecola | Nome commerciale | Dose | Giorni di somministrazione |
|--------|----------------------------|------------------|-----------------------|----------------------------|
| AMX1 | Amoxicillina | Supramox | 20 mg/kg P.V. BID | 4-5-6 |
| THP1 | Tiamfenicolo | Tisan | 67 mg/kg P.V. SID | 4-5-6 |
| AMX1 | Amoxicillina | Supramox | 20 mg/kg P.V. BID | 21-22-23 |
| AMX2 | Tiamfenicolo | Tirsan | 67 mg/kg P.V. SID | 21-22-23 |
| TRIM | Trimetoprim + sulfadiazina | Trimetosulfa | 20 + 4 mg/kg P.V. SID | 21-22-23-24-25 |
| K | | - | - | - |

Macellazione e prelievo dei campioni

Dal momento che sono stati rispettati i tempi di sospensione delle molecole antimicrobiche somministrate e in seguito alla remissione della sintomatologia sopra riportata, i broiler sono stati regolarmente macellati in seguito a stordimento e iugulazione presso un macello locale. Dopo la visita *post mortem* del veterinario ufficiale, i campioni tissutali di ileo, cieco e colon sono stati raccolti e fissati in formalina 10% e i contenuti intestinali di ileo e cieco sono stati campionati in condizioni asettiche e congelati a -80° C.

Estrazione del DNA e sequenziamento

Sei animali per ogni gruppo di trattamento sono stati casualmente selezionati e il rispettivo contenuto intestinale dei tratti ileo e cieco è stato analizzato (72 campioni totali). Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il kit *Maxwell RSC Fecal Microbiome DNA Kit* (Promega). La quantità e la qualità del DNA estratto sono state determinate utilizzando il kit *QuantiFluor dsDNA System* (Promega) e il *Nanodrop spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific). La preparazione delle librerie e il sequenziamento del *16S rRNA gene* sono state condotte presso un laboratorio esterno. Le regioni ipervariabili V3 e V4 del gene codificante per il 16S rRNA sono state amplificate utilizzando i primer universali 341F (CCTACGGGNGBCASCAG) e 805R (GACTACNVGGGTATCTAATCC). Per la preparazione delle librerie è stato utilizzato il *Nextera XT Index kit* (Illumina) e il sequenziamento è stato condotto con MiSeq con protocollo 2 x 300 bp *paired-end*.

Analisi delle sequenze

Le sequenze grezze sono state analizzate separatamente per i due tratti intestinali (ileo e cieco) con lo stesso protocollo bioinformatico. La qualità delle sequenze è stata controllata con il software FastQC v. 0.11.9. Successivamente l'analisi è stata condotta con Qiime2 v. 2021.4 (Caporaso et al., 2010), utilizzando la stessa pipeline descritta in un precedente lavoro (Cuccato et al., 2021). Brevemente, in seguito alla rimozione dei primer di sequenziamento le sequenze sono state classificate in *amplicon sequence variant* (ASV) e utilizzate nell'analisi di *alpha* e *beta diversity* delle comunità microbiche. Infine, la tassonomia è stata assegnata sulla base del database *Greengenes* al 99% d'identità.

Valutazione istopatologica

Dagli stessi animali selezionati per l'analisi del microbiota intestinale è stata condotta una valutazione istopatologica dei tessuti di ileo, cieco e colon. I campioni sono stati sezionati a 4 µm di spessore e colorati con Ematossilina-Eosina (HE). I preparati istologici sono stati osservati al microscopio ottico (Nikon Eclipse E600, Nikon), e le alterazioni sono state registrate seguendo uno *scoring system*, applicato precedentemente e opportunamente modificato per le caratteristiche del pollo da carne (Ruggeri et al., 2014). Sono state registrate le seguenti alterazioni: lesioni a carico dei villi e dell'epitelio intestinale, infiltrato infiammatorio a carico della mucosa e sottomucosa, attivazione delle tonsille cecali e presenza di congestione e/o emorragie. Diversi *score* numerici sono stati attribuiti alle specifiche lesioni secondo lo schema riportato in Tabella 2.

Tabella 2. *Scoring system* per la valutazione istopatologica dei tessuti intestinali del pollo da carne.

| | Lesione/Tipo | Gravità | Distribuzione |
|-----------------------------|--|--|--|
| Villi – Epitelio | 1 – 2 – 3 (disepitelizzazione - fusione dei villi - necrosi) | 1 – 2 – 3 (lieve - moderato - grave) | 1 – 2 – 3 (focale - disseminato - diffuso) |
| Infiltrato infiammatorio | Linfocitario/eosinofilico | 1 – 2 – 3 | 1 – 2 – 3 |
| Congestione | +/- (presente/assente) | | |
| Emorragie | - | 1 – 2 – 3 | 1 – 2 – 3 |

Analisi statistiche

Gli score totali ottenuti durante la valutazione istopatologica sono stati analizzati mediante test di Kolmogorov-Smirnov per valutarne la normalità di popolazione e successivamente analizzati con test ANOVA o Kruskal-Wallis, seguiti da Dunn's post test. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate in GraphPad Prism v.9. Sono stati considerati significativi valori di $p < 0,05$. Per quanto riguarda le analisi statistiche relative al microbiota intestinale, esse sono state condotte attraverso i test di Kruskal-Wallis (*alpha-diversity*) e PERMANOVA (*beta-diversity*) integrati nella pipeline di Qiime2.

RISULTATI

Microbiota intestinale

Dall'analisi delle sequenze del 16S batterico del microbiota intestinale di ileo e cieco è emerso che l'*alpha-diversity* delle comunità microbiche presentava significatività statistica solo per l'*evenness index* (ileo p -value $< 0,001$ – cieco p -value $< 0,006$). Invece, non sono state riscontrate differenze significative per il *faith index* (ileo p -value = 0,13 – cieco p -value = 0,48). Per quanto riguarda la *beta-diversity*, il test PERMANOVA ha rilevato una differenza statisticamente significativa tra le diverse comunità batteriche del cieco nei diversi gruppi di trattamento (p -value $< 0,001$), ma nei campioni di ileo lo stesso test è risultato non significativo (p -value 0,056). Infine, i risultati della tassonomia hanno rilevato che nell'ileo i *phyla* principali sono in ordine di abbondanza *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*, mentre nel cieco *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria*. È stata rilevata in 20 campioni su 36 una presenza superiore al 10% di batteri appartenenti al genere *Campylobacter*.

Istopatologia

Dal punto di vista istopatologico, sono state rilevate lesioni a carico dei villi e dell'epitelio intestinale, tra cui disepitelizzazione, fusione dei villi e necrosi. Inoltre, è stata rilevata la presenza di infiltrato infiammatorio di tipo linfocitario e in parte anche eosinofilico a carico di mucosa e sottomucosa di ileo, cieco e colon. Congestione vasale e presenza di emorragie mucosali apicali sono state rilevate nei diversi tratti esaminati. L'analisi statistica condotta ha rilevato alcune differenze statisticamente significative rispetto al gruppo K: nello score totale dell'infiltrato linfocitario muco-

sale di colon ($p\text{-value} = 0,0383$). In particolare, secondo il Dunn's post test l'infiltrato linfocitario a carico della mucosa del colon era statisticamente significativo nel gruppo AMX1 ($p\text{-value} = 0,018$).

DISCUSSIONE

Nel presente studio è emerso che il microbiota intestinale di ileo e cieco nei *broiler* è stato influenzato dal trattamento di profilassi antimicrobica in termini sia di quantità di batteri sia di diversità delle comunità microbiche. Infatti, l'*evenness index* presenta significatività statistica sia nell'ileo sia nel cieco. Invece, la *beta-diversity* ha mostrato di essere significativamente differente tra i diversi gruppi di trattamento nel cieco e non nell'ileo, dove si è riscontrata solo una tendenza alla significatività ($p\text{-value} = 0,056$). Questi risultati sono solo parzialmente in accordo con uno studio precedente condotto sul microbiota intestinale di *broiler* trattati con profilassi antimicrobiche (Cuccato et al., 2021). La comparsa di sintomatologia intestinale e il trattamento con doxiciclina somministrato a tutti gli animali potrebbero aver alterato la composizione del microbiota intestinale e potrebbe verosimilmente essere la causa delle differenze riscontrate rispetto allo studio precedente. Per quanto riguarda i risultati della tassonomia, il *phylum Firmicutes* risulta essere il più abbondante in tutti i campioni di ileo e cieco. Batteri appartenenti a questo *phylum* sono i principali colonizzatori del piccolo intestino dei polli da carne (Yeoman et al., 2012). Invece, in letteratura sono presenti risultati contrastanti su quale sia il *phylum* principale del cieco: *Firmicutes* (Yeoman et al., 2012) o *Bacteroidetes* (Xiao et al., 2017). Infine, la presenza cospicua di batteri appartenenti al genere *Campylobacter* spp. rappresenta un dato di interesse, dal momento che normalmente in polli sani tali microrganismi sono presenti sporadicamente (Awad et al., 2018; Sood et al., 2020). Inoltre, alcune specie di *Campylobacter* spp. costituiscono un rischio per la salute umana, essendo patogeni responsabili di zoonosi (Stanley et al., 2014; Awad et al., 2018; Sood et al., 2020). Dal punto di vista istopatologico sono state rilevate lesioni a carico dei villi e dell'epitelio di ileo, cieco e colon, così come la presenza di infiltrato linfocitario ed eosinofilo. L'analisi statistica non ha rilevato differenze significative tra i diversi gruppi di trattamento. La sintomatologia intestinale era presente in tutti i gruppi e trova conferma nei reperti istopatologici di necrosi a carico del cieco, disepitelizzazione, fusione dei villi, emorragie apicali e infiltrato infiammatorio. Alterazioni della barriera intestinale quali quelle riscontrate nel presente studio, sia nella composizione del microbiota intestinale sia dello stato dei tessuti intestinali, possono inficiare la salute e produttività dei polli da carne, nonché il benessere animale (Dal Pont et al., 2020; Tabler et al., 2020).

CONCLUSIONI

In conclusione, il presente studio mette in luce un possibile ruolo dei trattamenti antimicrobici nella modulazione delle diverse componenti della barriera intestinale del pollo da carne. La presenza cospicua di batteri appartenenti al genere *Campylobacter* spp. sottolinea la necessità di una particolare attenzione alla salute pubblica, non solo animale. I dati in nostro possesso non rendono possibile dimostrare che il trattamento di profilassi antimicrobica possa aver influito sulla comparsa della sintomatologia intestinale e sull'aggravamento della disbiosi e delle lesioni a

carico dei diversi tratti intestinali, tuttavia, gli antimicrobici sono considerati uno dei principali fattori di alterazione del microbiota intestinale con conseguenze sulla barriera intestinale e sull'ospite (Lauridsen, 2019; Kogut et al., 2020), pertanto ulteriori approfondimenti sarebbero opportuni.

BIBLIOGRAFIA

1. Awad, W. A., C. Hess, and M. Hess. 2018. Re-thinking the chicken-Campylobacter jejuni interaction: a review. *Avian Pathol.* 47:352–363.
2. Caporaso, J. G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F. D. Bushman, E. K. Costello, N. Fierer, A. Gonzalez Peña, J. K. Goodrich, J. I. Gordon, G. A. Huttley, S. T. Kelley, D. Knights, J. E. Koenig, R. E. Ley, C. A. Lozupone, D. McDonald, B. D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J. R. Sevinsky, P. J. Turnbaugh, W. A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld, and R. Knight. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 7:335–336.
3. Cuccato, M., S. Rubiola, D. Giannuzzi, E. Grego, P. Pregel, S. Divari, and F. T. Cannizzo. 2021. 16S rRNA sequencing analysis of the gut microbiota in broiler chickens prophylactically administered with antimicrobial agents. *Antibiotics* 10:1–10.
4. Dal Pont, G. C., M. Farnell, Y. Farnell, and M. H. Kogut. 2020. Dietary factors as triggers of low-grade chronic intestinal inflammation in poultry. *Microorganisms* 8:139.
5. Iacob, S., and D. G. Iacob. 2019. Infectious Threats, the Intestinal Barrier, and Its Trojan Horse: Dysbiosis. *Front. Microbiol.* 10:1–17.
6. Kers, J. G., F. C. Velkers, E. A. J. Fischer, G. D. A. Hermes, J. A. Stegeman, and H. Smidt. 2018. Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. *Front. Microbiol.* 9:235.
7. Kogut, M. H., A. Lee, and E. Santin. 2020. Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poult. Sci.* 99:1906–1913.
8. Lauridsen, C. 2019. From oxidative stress to inflammation: Redox balance and immune system. Pages 4240–4246 in *Poultry Science*. Oxford University Press.
9. Mehdi, Y., M. P. Létourneau-Montminy, M. Lou Gaucher, Y. Chorfi, G. Suresh, T. Rouissi, S. K. Brar, C. Côté, A. A. Ramirez, and S. Godbout. 2018. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim. Nutr.* 4:170–178.
10. Pawłowska, B., and B. M. Sobieszcząńska. 2017. Intestinal epithelial barrier: The target for pathogenic *Escherichia coli*. *Adv. Clin. Exp. Med.* 26:1437–1445.
11. Le Roy, C. I., M. J. Woodward, R. J. Ellis, R. M. La Ragione, and S. P. Claus. 2019. Antibiotic treatment triggers gut dysbiosis and modulates metabolism in a chicken model of gastro-intestinal infection. *BMC Vet. Res.* 15:1–13.
12. Ruggeri, J., M. Pesciaroli, B. Gaetarelli, F. E. Scaglione, P. Pregel, S. Ammendola, A. Battistoni, E. Bollo, G. L. Alborali, and P. Pasquali. 2014. Parenteral administration of attenuated *Salmonella Typhimurium* Δ znuABC is protective against salmonellosis in piglets. *Vaccine* 32:4032–4038.
13. Sood, U., V. Gupta, R. Kumar, S. Lal, D. Fawcett, S. Rattan, G. E. J. Poinern, and R. Lal. 2020. Chicken Gut Microbiome and Human Health: Past Scenarios, Current Perspectives, and Futuristic Applications. *Indian J. Microbiol.* 60:2–11.

14. Stanley, D., R. J. Hughes, and R. J. Moore. 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:4301–4310.
15. Tabler, T. W., E. S. Greene, S. K. Orłowski, J. Z. Hiltz, N. B. Anthony, and S. Dridi. 2020. Intestinal Barrier Integrity in Heat-Stressed Modern Broilers and Their Ancestor Wild Jungle Fowl. *Front. Vet. Sci.* 7:249.
16. Xiao, Y., Y. Xiang, W. Zhou, J. Chen, K. Li, and H. Yang. 2017. Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken. *Poult. Sci.* 96:1387–1393.
17. Xiong, W., Y. Wang, Y. Sun, L. Ma, Q. Zeng, X. Jiang, A. Li, Z. Zeng, and T. Zhang. 2018. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome* 6:1–11.
18. Yeoman, C. J., N. Chia, P. Jeraldo, M. Sipos, N. D. Goldenfeld, and B. A. White. 2012. The microbiome of the chicken gastrointestinal tract. *Anim. Health Res. Rev.* 13:89–99.
19. Yu, K., C. Mu, Y. Yang, Y. Su, and W. Zhu. 2017. Segment-specific responses of intestinal epithelium transcriptome to in-feed antibiotics in pigs. *Physiol. Genomics* 49:582–591.
20. Zhang, D., T. Shang, Y. Huang, S. Wang, H. Liu, J. Wang, Y. Wang, H. Ji, and R. Zhang. 2017. Gene expression profile changes in the jejunum of weaned piglets after oral administration of *Lactobacillus* or an antibiotic. *Sci. Rep.* 7:1–10.