

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO**

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Settore di Anatomia Patologica

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria



**EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI LARVE VIVE DI  
*HERMETIA ILLUCENS* SULLE PERFORMANCES DI  
CRESCITA E SULLA SALUTE INTESTINALE DI POLLI A  
COLLO NUDO IN ALLEVAMENTO BIOLOGICO**

**Candidato: Prai Federico**

**Relatore: Prof. Maria Teresa Capucchio**

**Correlatore: Dott.ssa Elena Colombino**

**A.A. 2021-22**

*“In un universo senza scopo,  
tutto è uguale  
e nulla vale la pena di un serio pensiero.  
Non ci resta che cogliere ciò che preferiamo e sorridere,  
rendendoci conto che  
dove non esistono autentiche direzioni  
l'una vale l'altra”*

*Howard Phillips Lovecraft*

# SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>5</b>
------------------------------	----------

## PARTE GENERALE

<b>2. ALLEVAMENTO BIOLOGICO: LEGISLAZIONE .....</b>	<b>7</b>
<b>3. IL POLLO A COLLO NUDO .....</b>	<b>8</b>
<b>4. UTILIZZO DEGLI INSETTI IN ZOOTECCIA .....</b>	<b>9</b>
4.1 LEGISLAZIONE .....	9
4.2 HERMETIA ILLUCENS .....	9
4.3 UTILIZZO NELLA ALIMENTAZIONE AVICOLA .....	12
4.4 BENEFICI NELL'UTILIZZO DELLE LARVE VIVE DI INSETTO IN AVICOLTURA.....	15
<b>5. ANATOMIA E ISTOLOGIA.....</b>	<b>16</b>
5.1 ANATOMIA DELL'APPARATO DIGERENTE E DELLE ghiandole ANNESSE.....	16
5.2 ANATOMIA DEL SISTEMA IMMUNITARIO .....	18
5.3 ISTOLOGIA DELL'APPARATO DIGERENTE E DELLE ghiandole ANNESSE.....	18
5.4 ISTOLOGIA DEI PRINCIPALI ORGANI LINFATICI .....	19
<b>6. SALUTE INTESTINALE: DEFINIZIONE E MARKER.....</b>	<b>21</b>
6.1 MORFOLOGIA E MORFOMETRIA INTESTINALE .....	22
6.2 GIUNZIONI INTERCELLULARI O TIGHT JUNCTION EPITELIALI.....	23
6.3 MARKER DEL SISTEMA IMMUNITARIO.....	24
6.4 LE MUCINE INTESTINALI .....	25
6.5 MICROBIOTA NEL POLLO .....	26
6.6 ULTERIORI MARKER DELLA SALUTE ANIMALE .....	27
<b>7. SCOPO DEL LAVORO .....</b>	<b>28</b>

## PARTE SPECIALE

<b>8. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>29</b>
8.1 ANIMALI E DIETA.....	29
8.2 PERFORMANCES DI CRESCITA .....	31
8.3 PROCEDURE DI MACELLAZIONE .....	31
8.4 CARATTERISTICHE DELLA CARCASSA.....	31

8.5 ANALISI ISTOMORFOMETRICHE .....	31
8.6 ESPRESSIONE GENICA DELLA MUCINA .....	33
8.7. ANALISI STATISTICA.....	34
<b>9. RISULTATI.....</b>	<b>35</b>
9.1 PERFORMANCES DI CRESCITA .....	35
9.2 CARATTERISTICHE DELLA CARCASSA.....	37
9.3 ANALISI ISTOMORFOMETRICHE .....	40
9.4 ESPRESSIONE GENICA DELLA MUCINA .....	48
<b>10. DISCUSSIONE.....</b>	<b>50</b>
10.1 PERFORMANCES DI CRESCITA .....	50
10.2 CARATTERISTICHE DELLA CARCASSA.....	51
10.3 ANALISI ISTOMORFOMETRICHE.....	52
10.4 MUC-2 .....	53
<b>11. CONCLUSIONI .....</b>	<b>55</b>
<b>12. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>56</b>
<b>13. SITOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>
<b>14. RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>64</b>

## 1. INTRODUZIONE

Le stime indicano che nei prossimi 40 anni la popolazione mondiale aumenterà di 2.25 miliardi e, a seguito dell'innalzamento del reddito di vita medio, la produzione di proteine di origine animale dovrà aumentare di pari passo per far fronte alla crescente domanda (Alexandratos, 2012). Infatti, alcune ricerche hanno già evidenziato un aumento del 204% nei consumi di carne dal 1960 al 2016 (Basu 2015) mentre altre evidenziano un aumento pari addirittura al 500% (Katare et al., 2020).

Allo stesso modo, con la necessità di aumentare la produzione di proteine di origine animale si assisterà anche all'aumento del quantitativo di CO<sub>2</sub> prodotta, dell'energia fossile utilizzata, dell'acqua richiesta, dello spazio destinato alle coltivazioni per produrre mangimi e all'allestimento di nuovi allevamenti. Questo comporterà un aumento della deforestazione in quanto le aree con clima favorevole alla crescita delle piante erbacee più usate nei mangimi, come la soia, sono localizzate nei paesi a clima temperato-caldo e costante tutto l'anno, dove sono anche presenti le aree boschive più estese del pianeta, che rappresentano preziose fonti d'ossigeno. È importante sottolineare anche che nel periodo compreso tra il 2014 e il 2016 il consumo mondiale di carne pro-capite è stato pari a 34.1 Kg/giorno, di cui circa il 60% di carne rossa (suino, pecora, bovino). Questo dato è particolarmente preoccupante poiché la carne rossa, soprattutto quella bovina, è quella che ha il maggior impatto ambientale a causa dei bassi indici di conversione e dei gas rilasciati a seguito delle fermentazioni ruminanti. Secondo gli studi di Gonzalez et al (2020) e di Pimentel et al. (2013), la quantità di CO<sub>2</sub> prodotta per 1 Kg di carcassa bovina è circa 5 volte maggiore rispetto a quella richiesta per 1 Kg di carcassa di pollame (22 Kg e 5.52 Kg, rispettivamente) e per produrre 1 Kcal di proteina bovina e suina servono quantità di energia fossile pari a circa 10 volte e 3.5 volte quelle necessaria per 1 Kcal di proteina di pollo (40 Kcal, 14 Kcal e 4 Kcal rispettivamente). Inoltre ogni anno in America il 90% del terreno coltivato perde suolo ad un rateo 13 volte superiore rispetto a quello sostenibile di 1 tonnellata/ettaro/anno, obbligando all'utilizzo di fertilizzanti commerciali e di ulteriore energia fossile (Pimentel et al., 2013).

Tuttavia, secondo le previsioni, le tipologie di carni destinate al maggiore aumento saranno quelle di suino nei paesi orientali e quelle di pollame nei paesi occidentali. Al contrario le altre tipologie di carne, soprattutto in Occidente, sembrerebbero destinate a vedere mantenuto costante o addirittura ridotto il loro consumo. Questo crescente interesse nei confronti della carne di pollo da parte dell'opinione pubblica può essere ricercato nella sua composizione percentuale di grassi, proteine e carboidrati più salutare rispetto alla carne rossa e al possibile contributo di quest'ultima allo sviluppo di tumori (soprattutto coloretta, prostatico e mammario) (González et al., 2020).

In questo contesto l'allevamento intensivo avicolo risulta essere quindi il meno impattante sull'ambiente rispetto alle altre specie zootecniche.

Tuttavia per la crescita del pollo in allevamento intensivo con cicli di produzione estremamente brevi, è necessario l'utilizzo di elevate quantità di soia e farina di pesce per far fronte all'importante richiesta di amminoacidi essenziali. Per ridurre, quindi, ulteriormente l'impatto ambientale causato dalla produzione di tali fonti proteiche per l'alimentazione animale e la competizione generata dalla possibilità di destinarle all'alimentazione umana è necessario ricercare nuove fonti più sostenibili ed economicamente vantaggiose. Gli insetti potrebbero essere un'ottima alternativa grazie al loro alto contenuto di proteine e grassi

(Khan, 2018). Inoltre gli insetti fanno parte della naturale dieta delle specie avicole allevate con tecniche di accesso all'esterno (Bovera et al., 2016).

Una delle specie di insetti più promettenti in questo senso è la larva di mosca soldato nera (*Hermetia illucens*, HI), un dittero della famiglia degli Stratomidi che è in grado di sfruttare un'ampia gamma di materiale organico in decomposizione per la sua crescita, rappresentando così un'opportunità per riciclare la materia organica in preziosi nutrienti (Cullere et al., 2019). Inoltre, nel corso degli anni, una sempre maggiore sensibilità al benessere animale, ha portato alla ricerca di metodi alternativi d'allevamento come l'allevamento biologico, normato dai Regolamenti EU 1538/91, 1804/99 e 834/2007 (Sirri et al., 2011). Tuttavia, i cicli di produzione estremamente lunghi, l'accesso all'esterno e l'utilizzo di razze più rustiche comportano indici di conversione più svantaggiosi e una minore sostenibilità ambientale ed economica rispetto all'allevamento intensivo (Pieper et al., 2020).

Tuttavia per il concetto di economia circolare, cioè una gestione aziendale che punta a rivalorizzare i materiali di scarto come le deiezioni, l'allevamento intra-aziendale di larve vive potrebbe essere un punto d'incontro tra la necessità di sostenibilità e quella di benessere. Rispetto al comprare e somministrare la semplice farina di insetto, l'allevamento di larve vive, utilizzando come substrato la pollina, permetterebbe di convertire le deiezioni in proteina animale da usare come mangime, potendo vantare quindi la caratteristica "km 0" (Makkar et al., 2014).

L'allevamento biologico, inoltre, richiede l'utilizzo di razze indigene a medio o lento profilo di crescita con almeno 81 giorni di vita prima della macellazione (Sirri et al., 2011), permettendo così di valorizzare razze autoctone e incrementando agli occhi del consumatore, la gestione eco-sostenibile a km 0 dell'azienda.

## 2. ALLEVAMENTO BIOLOGICO: LEGISLAZIONE

La maggiore consapevolezza dei consumatori sulle questioni relative alla sicurezza alimentare, al benessere animale e all'ecosostenibilità, ha contribuito alla crescita dell'agricoltura e dell'allevamento biologico, spingendo molte aziende agricole a modificare i propri allevamenti e adattarsi alla normativa (von Borell e Sørensen, 2004).

I requisiti generali che sono richiesti ad un prodotto/animale per essere definito biologico sono:

- provenienza da allevamenti che usino mangimi biologici, vietino l'uso di antibiotici, diano agli animali l'accesso all'aria aperta e alla luce solare,
- produzione secondo criteri che seguano le normative sanitarie, siano in armonia con l'ambiente secondo i principi di eco-sostenibilità come la presenza di cicli chiusi e sostenibili, promuovano la diversità biologica e terreni sani,
- commercializzazione di animali che sono stati allevati senza l'uso di antibiotici, pesticidi e antiparassitari persistenti (von Borell e Sørensen, 2004).

Il regolamento che norma la pratica del biologico a livello europeo è il Reg. CE 889/2008. Il Regolamento CE per il pollame biologico destinato alla produzione di carne, richiede che debba essere allevato almeno per 81 giorni con un periodo di buio continuo di almeno 8 ore. Inoltre, l'allevamento deve rispettare alcuni parametri strutturali specifici: almeno un terzo di ogni ricovero deve essere solido, vale a dire non composto da assicelle o da graticciato, e dev'essere ricoperto di lettiera composta ad esempio da paglia, trucioli di legno, sabbia o torba. In merito alla densità animale, l'allevamento non deve contenere più di 4800 polli e la superficie totale utilizzabile per ciascuna unità di produzione non deve superare i 1600 m<sup>2</sup>. Infine, il pollame deve poter accedere a parchetti all'aperto ricoperti di vegetazione, attraverso usci di dimensioni adeguate. Come densità al coperto è quindi consentito un massimo di 10 animali per m<sup>2</sup>, con non oltre 21 kg di peso vivo per m<sup>2</sup>. L'area esterna deve consentire invece almeno 4 m<sup>2</sup> per pollo in rotazione. Anche la razione deve rispondere a requisiti specifici in quanto in fase di ingrasso deve contenere almeno il 65% di cereali e foraggi freschi, essiccati o insilati.

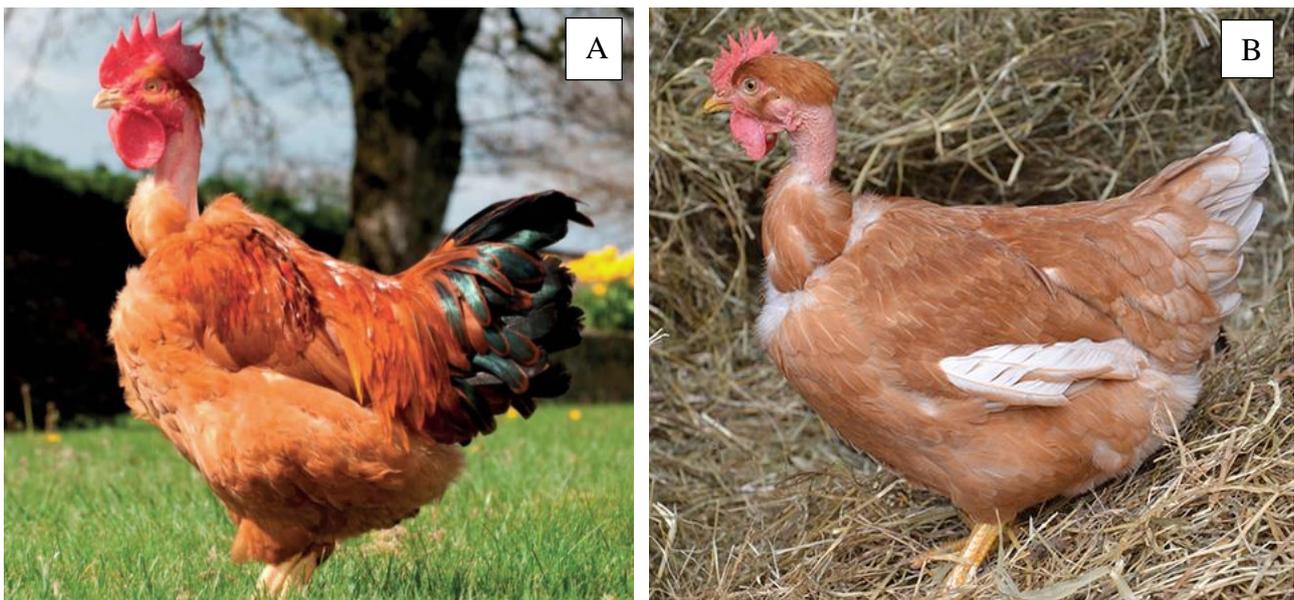
Per quanto riguarda i trattamenti è permesso al massimo un trattamento con antibiotici o con medicinali veterinari allopatici solo per motivi terapeutici e non in condizioni di profilassi.

### 3. IL POLLO A COLLO NUDO

Il pollo a Collo Nudo Italiano è una razza nata dopo la I Guerra Mondiale, generata dall'incrocio tra la razza Collo Nudo di Transilvania, diffusa in tutta Europa, con varie razze comuni italiane. Il suo uso è sempre rimasto relegato all'allevamento rurale, dove il suo incrocio con altre razze rustiche ha portato alla nascita di numerose differenze nella colorazione del piumaggio a seconda della regione (in Toscana da incroci con la Valdarnese bianca, in Piemonte con la Bionda Piemontese, mentre in Veneto da incroci con la Padovana comune). Tuttavia, rispetto alle altre varianti europee, le varianti italiane sono riconoscibili per il colore bianco degli orecchioni. E' una razza rustica a lento accrescimento, macellata intorno ai 5 mesi quando raggiunge il peso di 3.3 Kg per i maschi e 2.8 Kg per le femmine (<https://www.agraria.org/polli/collonudo.html>).

È generalmente caratterizzata da migliori performances di crescita rispetto alle altre razze indigene. Rispetto al broiler, pur avendo delle performances di crescita peggiori, è più resistente alle condizioni climatiche e alle malattie. La carne presenta, inoltre, un maggior contenuto proteico, un minor contenuto lipidico e un insieme di caratteristiche organolettiche che la rendono molto più saporita per il consumatore in confronto al broiler (Shafiq et al., 2022)

Il gene responsabile del fattore collo nudo (Na – naked neck) è un gene autosomico incompleto dominante dato che i soggetti eterozigoti sono dotati di un ciuffo di piume in corrispondenza del gozzo, assente invece negli omozigoti. Il gene del collo nudo è stato oggetto di studio per la maggiore capacità dei soggetti omozigoti di disperdere calore. Infatti, in condizioni di clima torrido (circa 30° C) sono in grado di raggiungere pesi su carcassa significativamente superiori rispetto al broiler, con un minor consumo idrico e di mangime oltre che un ridotto cannibalismo. E' stata tuttavia segnalata una mortalità embrionale media di poco superiore al 10%, più alta rispetto al broiler (5-6%) (<http://www.summagallicana.it/Volume3/C.XV.a.htm#3>).



**Figura 1.** Pollo a collo nudo: maschio(A); femmina (B)

## 4. UTILIZZO DEGLI INSETTI IN ZOOTECCNIA

### 4.1 LEGISLAZIONE

Gli insetti vivi o trattati (secchi, congelati, etc.) sono stati considerati possibile materia prima in un mangime in quanto invertebrati terrestri a partire dal Reg. 68/2013. Possono essere somministrati in qualunque stadio della loro vita, trattati o non trattati, per esempio freschi, congelati o essiccati, ma non devono appartenere a specie patogene, non devono essere riconosciuti come vettori di patogeni per l'uomo, gli animali o le piante e devono rispettare criteri ambientali per la salvaguardia delle specie autoctone. Sono inoltre soggetti al rispetto dei criteri microbiologici e dei limiti di contaminanti e sostanze indesiderate previsti dalla normativa comunitaria per le materie prime utilizzate per produrre mangimi (Direttiva CE 32/2202 e successive modifiche).

Se tali quali, gli insetti possono essere utilizzati in qualsiasi tipologia di allevamento (tranne per i ruminanti come citato dal Reg. CE 999/2001, art. 7) a patto di essere stati allevati su substrato vegetale o su substrato animale rappresentato solo da latte, uova o i loro prodotti derivati di categoria 3, come definito dal Reg. CE 1069/2009. Sono quindi esclusi feci, urine e contenuto del tubo digerente. Sono inoltre esclusi tutti i rifiuti di cucina e ristorazione, così come gli ex prodotti alimentari contenenti carne e pesce come indicato nel Reg. CE 142/2011. Ai sensi del Reg. CE 999/2001, gli insetti non possono essere alimentati nemmeno con proteine animali trasformate (tranne che con quelle di pesce), prodotti a base di sangue, gelatina e collagene derivati da ruminanti e proteine idrolizzate derivanti da ruminanti (tranne quelle derivate da cuoio e pelli).

Per quanto riguarda le proteine animali trasformate (PAT) di insetto, sempre definite dal Reg. 68/2013, queste fino a poco tempo fa erano utilizzabili solo negli animali da compagnia, da pelliccia e in acquacoltura. Recentemente, ne è stato autorizzato l'utilizzo nell'allevamento di pollo e suino con il Reg. CE 1372/2021. Permane l'obbligo di evitare cross-contaminazioni con i mangimi destinati a ruminanti e non ruminanti, non inclusi nella deroga. Attualmente con il Reg. 893/2017, sono autorizzate per la produzione di PAT queste 7 specie di insetto:

1. Mosca soldato nera (*Hermetia illucens*)
2. Mosca domestica (*Musca domestica*)
3. Tenebrione mugnaio o tarma della farina (*Tenebrio molitor*)
4. Alfitobio (*Alphitobius diaperinus*)
5. Grillo domestico (*Acheta domesticus*)
6. Grillo fasciato (*Gryllodes sigillatus*)
7. Grillo silente (*Gryllus assimilis*)

Tra queste specie, *Hermetia illucens* sembra essere la più promettente.

### 4.2 HERMETIA ILLUCENS

La mosca soldato nera (*H. illucens*) è una mosca appartenente alla famiglia degli Stratiomidi. È nativa delle zone tropicali, subtropicali e temperate dell'America, ma l'aumento degli scambi commerciali sin dal 1940 ha portato alla sua diffusione in molte altre regioni comprese tra il 45° Parallelo Nord e il 40° Parallelo sud, caratterizzate da un clima simile a quello

d'origine. La presenza è più abbondante nei mesi caldi, dalla tarda primavera sino all'autunno (Makkar et al., 2014).

L'adulto (Fig. 2) è di colore nero, di aspetto simile ad una vespa anche se presenta due ali al posto di 4 e nessun pungiglione, ed è lungo 15-20mm. Un tratto distintivo della specie è la presenza di due bande traslucide sul primo segmento addominale. Questi insetti si accoppiano a partire da due giorni dopo l'uscita dal bozzolo, quando il maschio, sedentario e territoriale, intercetta una femmina nel territorio. La femmina può depositare fino a 500 uova vicino o all'interno di materiale organico in decomposizione. Le uova sono ovali di circa 1 mm di lunghezza, di colorito giallastro pallido e si schiudono in circa 4 giorni. Le larve (Fig. 3) possono misurare fino a 27 mm in lunghezza e 6 mm in larghezza e pesare fino a 220 mg nel loro ultimo stadio pre-pupa. La larva può nutrirsi velocemente, ingerendo dai 25 mg ai 500 mg al giorno di un'ampia gamma di materiale organico in decomposizione come frutta, verdura, letame ed escrementi (Makkar et al., 2014). In condizioni ideali le larve diventano adulte in 2 mesi, ma lo stadio larvale può durare anche fino a 4 mesi se il substrato non è adeguato in termini di quantità o qualità. Alla fine dello stadio larvale (pre-pupa), la larva smette di nutrirsi e migra in cerca di un luogo asciutto dove impuparsi. Lo stadio di pupa può durare da 14 giorni fino a 5 mesi (Diciaro II e Kaufman, 2009).

L'allevamento di *Hermetia illucens* (HE) è stato proposto sin dagli anni 90' come efficace strumento di gestione dei rifiuti organici grazie alla voracità dello stadio larvale nel consumare il substrato in cui è collocato. L'estrema velocità di degradazione riduce al minimo la crescita batterica (es. *Escherichia coli* 0157:H7 e *Salmonella enterica*) e la comparsa di odori, dimostrandosi estremamente efficace nello smaltimento della pollina e delle feci suine e riducendo il fosforo e l'azoto rispettivamente del 61-70% e 30-50% (Makkar et al. 2014).

È una specie estremamente resistente a condizioni di siccità, carestia e mancanza di ossigeno. Inoltre, la mosca soldato nera è un pessimo vettore di patogeni in quanto tende a ignorare animali o umani e nella fase adulta non si nutre ma vive del grasso accumulato nello stadio larvale. La presenza delle larve di HE agisce, inoltre, da repellente nei confronti della mosca domestica (*Musca domestica*), maggiore vettore di patogeni dato che rende il substrato eccessivamente liquido (Čičková et al., 2015).

La larva nel suo stadio finale è caratterizzata dal 36-48 % di proteine e 31-33% di grassi, rendendola un ottimo mangime per molti tipi di allevamento, a partire dall'acquacoltura. Può essere utilizzata anche nella produzione di biodiesel e chitina (Diener et al., 2011). Inoltre le estreme capacità di arrampicarsi nella ricerca del sito dove effettuare la metamorfosi, ne permettono l'auto-raccoglimento al di fuori del contenitore del substrato (Makkar et al., 2014).

Nonostante questi benefici, il suo impiego è molto difficile nelle regioni fredde o durante i mesi invernali, freddi e secchi nelle regioni temperate poiché per l'ovodeposizione sono richiesti almeno 26°C e un range di umidità compreso tra il 30-90% e per l'accoppiamento necessita di luce solare e di un discreto spazio (almeno 66m<sup>3</sup>) ricco in vegetazione, a causa della territorialità e dell'accoppiamento in volo.

L'utilizzo di serre che dispongano di queste condizioni aumenta i costi e permette di raggiungere un tasso di schiusa pari solo al 60% rispetto a quello ottenuto in natura (Čičková et al., 2015).



**Figura 2.** *Adulto di Hermetia illucens (Diclaro II e Kaufman, 2009)*



**Figura 3.** *Larva di Hermetia illucens (Diclaro II e Kaufman, 2009)*

#### 4.3 UTILIZZO NELLA ALIMENTAZIONE AVICOLA

Le larve di mosca soldato nera vengono somministrate vive, tritate o essiccate e macinate. Esse sono estremamente facili da disidratare rispetto ad altri bioprodotto grazie al loro contenuto di sostanza secca (SS) su larva fresca del 35-45%.

La composizione delle larve di *Hermetia illucens* in confronto alle principali fonti proteiche vegetali e animali usate in avicoltura è riportata nella Tabella 1.

Esse sono una ricca fonte di proteine con circa il 36-48% di proteina grezza su SS. Particolarmente ricche di lisina (6-8% su SS), si distinguono dai cereali proprio per avere alti livelli di amminoacidi essenziali quali metionina, treonina e appunto lisina. Rispetto alla farina di soia, uno dei mangimi più utilizzati in campo avicolo, le larve disidratate della mosca soldato nera possiedono quantità tre volte maggiori di lisina, un quantitativo di treonina, valina e isoleucina decisamente maggiori e di metionina e arginina di poco superiori.

Comparata agli altri insetti, la mosca soldato nera presenta un elevato quantitativo di grassi anche se la percentuale è estremamente variabile e dipende dal tipo di substrato su cui cresce: 15-25% su SS se cresciuta su pollina, 28% su SS su letame di suino, 35% su SS su letame bovino (Makkar et al., 2014).

È naturalmente ricca di acidi grassi saturi, soprattutto acido palmitico (C16:0) e laurico (C12:0). L'acido laurico è un acido grasso saturo a media catena conosciuto per i suoi effetti anti-microbici contro batteri Gram-positivi e per la sua capacità di diminuire i rischi cardiovascolari nell'uomo, innalzando la frazione HDL di colesterolo.

HI è inoltre mediamente ricca di acido linoleico (C18:2n-6) e, rispetto alla maggior parte degli alimenti di origine animale, presenta un rapporto acido linoleico/acido alfa-linoleico (n6/n3) più basso, compreso tra il 6.1-11.1/1, considerato più salutare per l'uomo (Li et al., 2022).

Tuttavia, la sua composizione dipende in larga parte dal tipo di substrato: su un substrato di letame bovino l'acido laurico, palmitico, oleico, e gli omega-3 sono risultati pari a 21%, 16%, 32% 0.2% mentre su un substrato al 50% di letame bovino e 50% di frattaglie di pesce sono pari a 43%, 11%, 12% e 3%, rispettivamente (Makkar et al., 2014).

Le larve essiccate di mosca soldato nera sono, quindi, un'interessante alternativa ad altri fonti di grasso meno ecologiche come olio di pesce o di soia, ma per ottenere la composizione voluta deve essere formulato un substrato ad hoc.

Il contenuto di ceneri è relativamente alto, ma variabile in relazione allo stadio della larva e al tipo di substrato, dall'11 al 28% su SS. Le larve sono ricche di calcio (5-8% su SS) e fosforo (0.6-1.5% su SS) (Makkar et al., 2014). Inoltre, Liu et al. (2017) hanno riscontrato alte concentrazioni di vitamina E (6.68 mg/100 g) e fosforo (350mg/100g) all'interno di un mangime di mosca soldato nera maturata 14 giorni.

Negli studi condotti sui broiler si è visto che somministrando il 5% di larve di mosca soldato nera nella dieta, si otteneva un peso uguale (J. Lee et al. 2018) o superiore (Dabbou et al, 2018) rispetto all'utilizzo di una dieta a base di farina soia. Tuttavia sempre Dabbou et al. (2018), hanno osservato che broiler alimentati con percentuali più alte di inclusione di larve (pari al 15% di SS) mostravano peggiori performances rispetto a quelli alimentati con minori percentuali (5%) o alimentati con la farina di soia, per un probabile effetto negativo dovuto alla chitina.

La chitina è uno dei principali componenti dell'esoscheletro degli artropodi e della parete cellulare dei funghi e, dopo la cellulosa, è il biopolimero più abbondante in natura. Si tratta di un polisaccaride costituito da più unità di N-acetilglucosamina; questo insieme ai legami a idrogeno tra i diversi polimeri adiacenti garantisce all'esoscheletro degli artropodi una

notevole durezza legata ad una certa flessibilità. La chitina e i suoi derivati, come il chitosano (prodotto della deacetilazione della chitina) e i chito-oligosaccaridi (COG - prodotti degradati del chitosano o della chitina), hanno attratto sempre maggior interesse grazie al loro grande valore economico e biologico. Ad oggi, infatti, trovano varie applicazioni nel settore alimentare, cosmetico, farmaceutico, tessile, agricolo o nel trattamento delle acque reflue. Ad esempio alcuni derivati della chitina sono noti per essere non-allergenici o biodegradabili e questo li rende ottimi materiali per le protesi umane (Lee et al., 2008).

Il contenuto di chitina all'interno delle larve di mosca soldato nera cambia in base allo stadio vitale in cui si trova con il 5.41% su SS in periodo intermedio di crescita, fino a raggiungere l'8.72% su SS nella fase di pre-pupa. Contrariamente ai mammiferi, il pollo insieme al topo (*Mus musculus*) e all'usignolo (*Luscinia megarhynchos*), sarebbe un ottimo produttore di chitinasi, un enzima in grado di digerire la chitina (Abd El-Hack et al.;2020),. La sua attività si esplicherebbe però solo in presenza di un pH di 2.0-2.3 e quindi solo a livello del proventriglio. Questo spiegherebbe i benefici e gli svantaggi della chitina e i suoi derivati. Infatti, la componente degradata dallo stomaco in COG garantirebbe un'attività anti-ossidante e anti-microbica. Inoltre la natura poli-anionica dei COG interferirebbe con il metabolismo dei batteri legandosi alla loro parete cellulare.

Tuttavia, la chitina non è completamente digeribile e se una piccola quantità di chitina indigerita può stimolare le fermentazioni di batteri produttori di acidi grassi a corta catena, estremamente positivi per la salute intestinale, una quantità troppo alta agirebbe come materiale fermentescibile per la crescita di batteri patogeni, incidendo negativamente sulle performances e sulla salute intestinale. Inoltre Muzzarelli (2010) ha dimostrato che la chitina e i suoi derivati, stimolerebbero un incremento nel reclutamento delle cellule immunitarie innate e nella produzione di citochine infiammatorie. La chitina potrebbe essere, quindi, un interessante strumento per ridurre l'utilizzo di antibiotici in allevamento (Abd El-Hack et al. 2020).

**Tabella 1.** Percentuali di proteina grezza, grasso grezzo, e aminoacidi essenziali su sostanza secca (SS) nelle più comuni fonti proteiche usate in avicoltura (Abd El-Hack et al. 2020)

Fonte di Proteine	Proteina grezza in %	Grasso grezzo in %	Lisina in % su SS	Metionina in % su SS	Treonina in % su SS	Arginina in % su SS	Valina in % su SS	Isoleucina in % su SS
Farina di <i>Hermetia illucens</i>	49,47	18,11	2,71	0,87	1,95	2,47	3,11	2,21
Farina di soia	44,0	0,80	1,00	0,60	1,05	2,30	1,60	1,00
Farina di pesce (aringa)	72,3	10,0	5,47	2,16	3,07	4,21	3,90	3,23
Farina di mais	62,0	2,50	1,03	1,49	2,00	1,82	2,78	2,45
Farina di girasole	32,0	1,10	2,69	0,62	1,72	3,14	2,07	1,96
Farina di semi di canola	38,0	3,80	1,94	0,71	1,53	2,08	1,76	1,37
Farina di semi di Sesamo	43,8	6,50	0,91	1,22	1,40	4,68	1,91	1,51

#### 4.4 BENEFICI NELL'UTILIZZO DELLE LARVE VIVE DI INSETTO IN AVICOLTURA

Secondo gli obiettivi di performances Aviagen, l'azienda responsabile della selezione del broiler Ross 308, i broiler femmine a peso leggero e i broiler maschi a peso medio, sono in grado rispettivamente di raggiungere 1.589 kg in 30 giorni e 2.811 Kg in 40 giorni, con incrementi giornalieri rispettivamente di 80g e 105g circa.

Questa crescita estremamente rapida, spinta dalla selezione genetica, porta facilmente allo sviluppo di zoppie causate da alterazioni nella crescita delle ossa. Inoltre, indirettamente, la presenza di acqua e mangime sempre nelle vicinanze dell'animale (secondo la normale distribuzione delle mangiatoie prevista negli allevamenti intensivi), così come l'elevata densità degli individui, portano l'animale a camminare meno con un conseguente aumento della prevalenza di zoppie (Ipema et al., 2020). Infatti, secondo Ipema et al. (2020), tra il 30% e il 50% dei capi in allevamento mostra una ridotta capacità di deambulazione. Il decubito su lettiera provocato dal dolore della zoppia può occupare anche il 60-80% della giornata di un broiler, portando ad un più facile sviluppo di dermatiti da contatto per l'alta carica di aggregati ammoniaci della lettiera, soprattutto nelle ultime fasi di allevamento.

Diversi studi hanno dimostrato che stimolare l'attività motoria nel broiler in età giovanile può portare ad un'effettiva riduzione nell'incidenza di zoppie e, quindi, ad un maggior benessere degli animali in allevamento. Tuttavia, ridurre la quantità di bevande e mangiatoie e la densità della popolazione possono avere impatti negativi rispettivamente sul benessere degli animali e sul reddito aziendale. Al contrario, una soluzione efficace potrebbe essere la stimolazione dell'attività di foraggiamento. Si è visto che la somministrazione di larve vive di insetto, almeno nelle prime ore successive alla somministrazione, incrementa notevolmente l'attività degli animali, che continuano a cercare le larve nella lettiera, tramite la pratica definita "foraging" (Pichova et al., 2016). In aggiunta il fatto che siano vive e mobili le rende molto più interessanti per i polli, aumentandone il livello di interazione rispetto ad un oggetto stazionario verso cui tendono a perdere rapidamente interesse (Jones et al., 1998).

## 5. ANATOMIA E ISTOLOGIA

### 5.1 ANATOMIA DELL'APPARATO DIGERENTE E DELLE ghiandole ANNESSE

L'apparato gastroenterico degli uccelli si differenzia da quello dei mammiferi per la presenza di organi piccoli tali da permettere il volo, ma adatti anche a sostenere l'elevato metabolismo con pasti piccoli ma frequenti.

È composto da un becco, adatto nei granivori per rompere semi, mentre nei carnivori svolge una funzione simile ai premolari di cane e gatto e dalle ghiandole salivari tubulari presenti nel cavo orale che producono mucina, un proteoglicano con la funzione di proteggere l'epitelio gastroenterico, e, in alcune specie, amilasi. Si continua con un'orofaringe, un esofago, e in alcune specie il gozzo, una dilatazione sacciforme dell'esofago a pH neutro dove può avvenire la degradazione dell'amido. Prosegue poi nello stomaco diviso in proventriglio, ad azione ghiandolare simile a quella dei mammiferi, dove inizia la digestione dei peptidi, e in ventriglio ad azione muscolare. Qui, la contrazione alternata tra i diversi strati muscolari lisci, perpendicolari tra di loro, permette il rimescolamento del chimo e, in associazione ai dei piccoli sassi presenti all'interno del lume, la sua macinazione. L'organo è a forma di lente e l'interno è allungato da due sacchi ciechi, uno craniale a contatto con il proventriglio e uno caudale (Sjaastad e Hove 2013).

Si continua con l'intestino, che occupa la parte caudale della cavità addominale, a stretto contatto con lo stomaco e gli organi riproduttori. È diviso in duodeno, digiuno, ileo e colon, che termina nella cloaca. Nelle specie erbivore, dalla giunzione ileocolica emergono 2 ciechi. Il duodeno passa caudalmente alla superficie destra dello stomaco, forma un'ansa ad U, all'interno della quale è contenuto il pancreas, e termina con la giunzione duodeno-digiunale vicino allo stomaco. La maggior parte dell'ansa, divisa in duodeno discendente e ascendente, è appoggiata al pavimento dell'addome e funge da sbocco per i dotti pancreatici e biliari.

Il digiuno è avvolto al mesentere ed è tanto sottile da prendere il colore verdastro del contenuto. La presenza del diverticolo di Meckel, vestigia embrionale del sacco vitellino, permette di distinguere questo tratto dall'ileo che continua il digiuno senza alcuna demarcazione.

Al termine dell'ileo, a livello della giunzione colica, nascono i due ciechi, particolarmente lunghi in pollo e tacchino, con direzione retrograda rispetto al corso intestinale. Sono affiancati all'ileo, a cui sono legati dai legamenti ileocecali. Il segmento prossimale costituisce con la sua muscolatura lo sfintere cecale e contiene la cosiddetta tonsilla cecale, ricca di tessuto linfoide. Il segmento centrale ha pareti sottili che lasciano apparire il contenuto verdastro. È qui che avviene la digestione della cellulosa, nonché la fermentazione dei carboidrati e l'assorbimento degli acidi grassi volatili. Il fondo cieco ha pareti molto più spesse, è raggiunto dal contenuto del lume tramite contrazioni antiperistaltiche, e per una piega ad U che compie il cieco è situato nelle vicinanze della cloaca. Il retto è lungo circa 10 cm nel pollo e termina allargandosi nella cloaca; qui vengono riassorbiti acqua ed elettroliti (Singh e Dyce 2018). La cloaca funge da sbocco verso l'esterno per l'apparato gastroenterico e quello urogenitale.

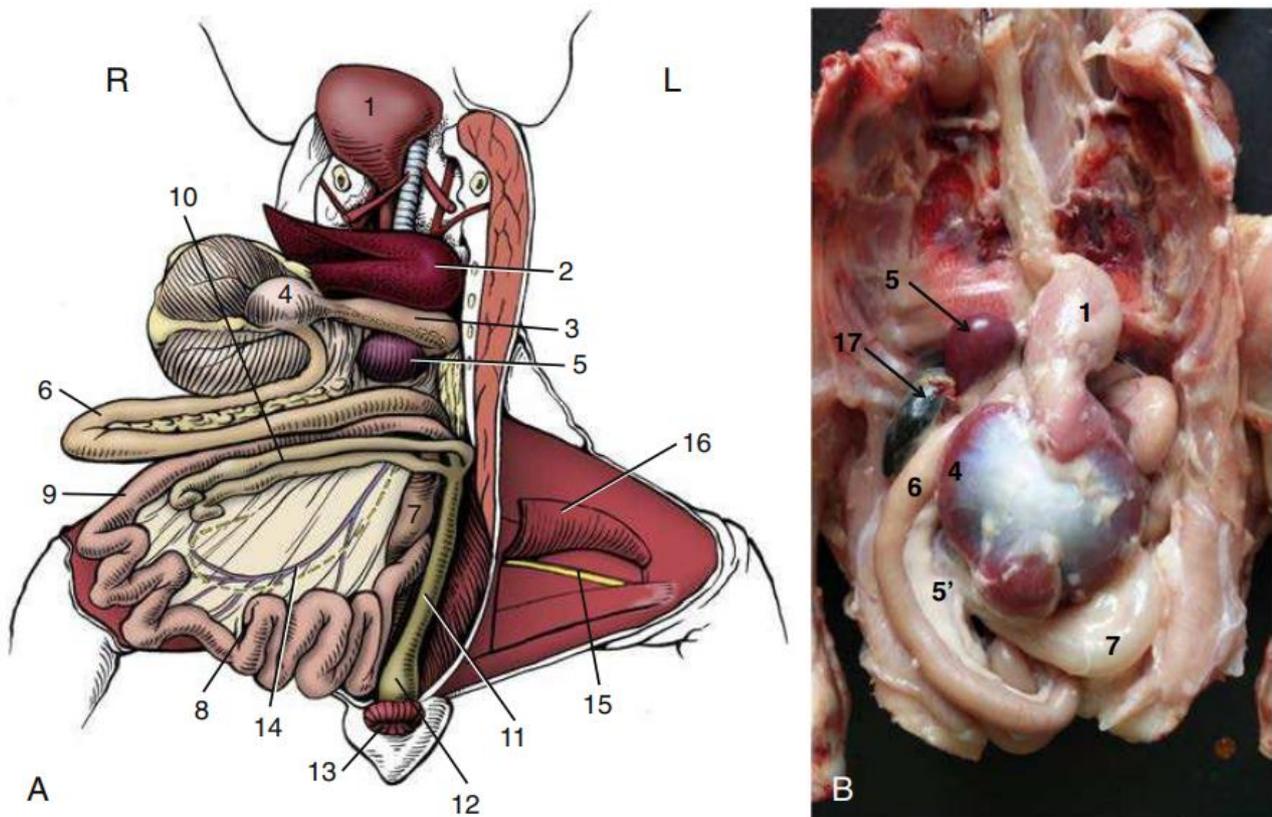
Due ghiandole sono poi associate all'apparato digerente, il fegato e il pancreas.

Il fegato è di colore marrone scuro, ad eccezione delle prime 2 settimane dopo la schiusa, quando si presenta giallo per la presenza del pigmento del tuorlo. Diviso in un lobo destro e due sinistri, il fegato è in diretto contatto con il pericardio data l'assenza del diaframma. La

cistifellea, assente in alcune specie, è situata sulla faccia viscerale, e da essa parte il dotto biliare del lobo destro.

Il pancreas è alloggiato nell'ansa del duodeno, si presenta di colore giallastro, e consiste in un lobo dorsale e uno ventrale. È composto di una parte a funzione esocrina e di una a funzione endocrina. La componente esocrina, secerne in duodeno, attraverso i dotti pancreatici dei succhi digestivi contenenti enzimi. La componente endocrina comprende le isole pancreatiche, aggregati di cellule tra gli acini deputati alla funzione esocrina, produttrici di insulina, glucagone e gastrina (Sjaastad e Hove 2013).

Le immagini **4A** e **4B** mostrano l'anatomia del tratto gastro intestinale; si possono anche evidenziare il pancreas, il fegato e la milza e altre strutture regionalmente vicine.



**Figura 4.** (A) Tratto gastrointestinale dopo il ribaltamento verso il basso di parte dell'intestino. L, sinistra; R, destra. (B) Stomaci e ansa del duodeno. 1, Gozzo; 2, Fegato (lobo sinistro); 3, Proventriglio; 4, sacco cieco craniale del ventriglio; 5, milza; 5' pancreas; 6, ansa del duodeno; 7, digiuno; 8, diverticolo di Meckel; 9, ileo; 10, ciechi; 11, colon; 12, cloaca; 13, orifizio anale; 14, mesentere craniale e nervo intestinale; 15, nervo sciatico e arteria ischiatica; 16, gracile e adduttore; 17, cistifellea. (Singh e Dyce 2018)

## 5.2 ANATOMIA DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Per quanto riguarda il sistema immunitario, le specie avicole, non hanno la stessa distribuzione anatomica dei mammiferi. Solo l'oca e l'anatra, infatti, hanno delle strutture comparabili ai linfonodi vicini ai reni e in regione cervico-toracica. Le altre specie presentano solo dei microscopici linfonodi nella parete dei dotti linfatici, a livello di fegato, pancreas, polmoni e reni, e degli aggregati linfatici in orofaringe (BALT) e intestino (GALT). Tuttavia presentano 3 organi che hanno un ruolo centrale nella gestione immunitaria: il timo, la milza, e la borsa di Fabrizio.

La borsa di Fabrizio, ospitata nella cloaca, è di forma globosa nel pollo. Qui è dove avviene la differenziazione dei linfociti B nell'animale immaturo. Essa va incontro a regressione, spesso completa all'inizio della maturità sessuale.

La milza, dalla forma sferoide, ma leggermente differente a seconda della specie, si presenta di circa 2 cm di diametro, ha una colorazione marrone-rossastra ed è situata posteriormente al ventriglio. È a diretto contatto con il fegato cranioventralmente.

Il timo consiste in una serie di lobi separati, associati alle vene giugulari. I lobi sono divisi in lobuli, ciascuno dei quali consiste in una corticale scura e una midollare pallida. È qui che avviene la maturazione dei linfociti T, provenienti dal midollo osseo. Il timo, ben sviluppato in età giovane, regredisce completamente con il raggiungimento della maturità sessuale (Singh e Dyce 2018).

## 5.3 ISTOLOGIA DELL'APPARATO DIGERENTE E DELLE GHIANDOLE ANNESSE

Per quanto riguarda l'apparato digerente, l'intestino è composto da 4 tonache, che, a partire dall'interno, sono: mucosa, sottomucosa, muscolare e sierosa.

La mucosa è caratterizzata a sua volta da tre strati: epiteliale, connettivale e muscolare. Lo strato epiteliale è caratterizzato dai villi intestinali, piccole protrusioni ricoperte da uno strato di epitelio, che ampliano la superficie che viene a contatto con il contenuto del lume, aumentando l'assorbimento. L'aspetto e la morfologia dei villi sono profondamente influenzati, oltre che da differenze di specie, dalla dieta o da patologie del singolo individuo. Alla base dei villi, sono situate le microscopiche ghiandole intestinali, definite "cripte di Lieberkuhn". Le cripte ospitano le cellule caliciformi mucipare, che secernono muco che ricopre la superficie dell'intestino, enzimi che contribuiscono alla digestione di carboidrati e proteine, cellule che matureranno in enterociti e le cellule di Paneth, responsabili della produzione di peptidi antimicrobici. Affiancate alle cripte, sporadicamente compaiono le cellule eterocromaffine, appartenenti al sistema enteroendocrino. Queste, attraverso la regolazione dei nervi intrinseci contenuti nello strato connettivale, secernono una serie di ormoni deputati alla regolazione dell'attività gastrointestinale, come la colecistochinina, che provoca la contrazione della cistifellea. Lo strato connettivale è ricco di noduli appartenenti al sistema linfoide, isolati o aggregati nelle placche del Peyer, che tendono a diventare più numerosi con il progredire verso il colon (Singh e Dyce 2018). All'esterno dello strato connettivale è presente un sottile strato di muscolatura liscia, la *muscularis mucosae*, che può causare movimenti locali della mucosa, tali da aumentare la velocità di assorbimento.

Al di sotto della mucosa è presente un altro spesso strato di tessuto connettivo, la sottomucosa, che contiene vasi ematici e linfatici e vasi di minor calibro che si dirigono sia verso la mucosa

che verso la *muscularis externa*. La sottomucosa contiene inoltre un plesso nervoso chiamato plesso sottomucoso.

Lo strato muscolare o *muscularis externa* è deputato alla motilità. Nell'intestino avvengono due tipi di contrazioni, quelle di segmentazione o rimescolamento, garantite da un fascio muscolare anulare più interno che permette appunto il continuo rimescolamento del contenuto, e quelle di peristalsi, garantite da un fascio perpendicolare al primo più esterno che consente la progressione lungo il corso intestinale. Tra i due fasci è presente il plesso nervoso mienterico.

La porzione più esterna, chiamata sierosa, è costituita da un sottile strato di tessuto connettivale coperto da un singolo strato di cellule epiteliali squamose, il foglietto viscerale del peritoneo (Sjaastad e Hove 2013).

Il fegato è strutturato in lobuli. Le ramificazioni della vena porta e dell'arteria epatica sono localizzate alla periferia e il sangue proveniente da entrambe scorre all'interno dei capillari epatici (sinusoidi) verso il centro del lobulo dove il sangue si raccoglie nella vena centrolobulare. L'epitelio fenestrato dei capillari sinusoidi permette il passaggio di grosse molecole come le proteine dal plasma sanguigno agli epatociti. La bile viene escretata nei canalicoli biliari, piccoli canali localizzati tra le cellule epatiche, che si raccolgono nel dotto biliare alla periferia del lobulo (Sjaastad e Hove 2013).

Il pancreas microscopicamente è strutturato in una componente esocrina, organizzata a gruppi di acini in maniera simile alle ghiandole salivari, e una componente endocrina, le cui cellule sono organizzate in aggregati detti isole di Langerhans, disseminati per l'intera ghiandola. L'organizzazione degli acini ricorda quella dei grappoli d'uva, costituiti da un singolo strato di cellule colonnari che circondano il lume. Le secrezioni che provengono dai gruppi di acini fluiscono attraverso piccoli dotti escretori, i dotti intercalati, per poi confluire nei dotti pancreatici. Le cellule endocrine, che rappresentano circa il 2% di tutta la massa del pancreas, si distinguono in cellule  $\beta$ , deputate a secernere l'insulina, cellule  $\alpha$  che producono il glucagone cellule  $\sigma$  che sintetizzano la somatostatina, che ha una funzione di controllo sulla secrezione paracrina di insulina e glucagone, e cellule denominate PP che producono il polipeptide pancreatico, con funzione di controllo gastrointestinale (Sjaastad e Hove 2013).

#### 5.4 ISTOLOGIA DEI PRINCIPALI ORGANI LINFATICI

La milza è un organo dotato di una capsula esterna di tessuto connettivo. All'interno il parenchima è diviso in polpa rossa e polpa bianca che si sviluppano intorno alle arteriole. La polpa rossa consiste in un insieme di elementi cellulari corpuscolati del sangue e di seni venosi. La polpa bianca è invece distribuita in aggregati linfoidi di forma cilindrica intorno alle arteriole centrali (Singh e Dyce 2018).

La borsa di Fabrizio è un organo cavo la cui parete è composta dall'esterno verso l'interno, da tunica avventizia, muscolare e mucosa. La mucosa è tappezzata da epitelio cilindrico o pseudostratificato e si solleva in 11-13 pliche principali, ciascuna delle quali appare suddivisa in 6-7 pliche secondarie. La lamina propria della mucosa fornisce una trama per i numerosi follicoli linfatici. I follicoli sono costituiti da una corticale di linfociti e cellule reticolari molto addensati, una zona intermedia di cellule epiteliali e una midollare di cellule reticolo-epiteliali e linfociti meno addensati rispetto alla corticale. Alla base delle pliche decorrono i vasi sanguigni i quali danno poi origine alle reti di capillari che invadono la corticale dei follicoli.

La regressione dell'organo avviene con la diminuzione dei linfociti della corticale e della midollare. Il reticolo epiteliale va incontro a metaplasia dando origine a strutture acinose tappezzate da epitelio cilindrico o pseudostratificato. Segue poi una fibrosi generalizzata con progressiva riduzione di volume dell'intero organo, che generalmente si presenta poi come una piccola formazione nodulare (Singh e Dyce 2018).

I lobi del timo sono divisi in lobuli dalla capsula connettivale che circonda l'organo attraverso dei setti in cui confluiscono arterie, vene e nervi. Un singolo strato di cellule epiteliali separa la corticale dalla capsula. La corticale del timo è costituita da un'impalcatura di cellule epiteliali infiltrata da densi agglomerati di linfociti. La midollare è costituita da cellule epiteliali più voluminose con una minor densità di linfociti. A questo livello sono presenti anche le cellule di origine ematopoietica come le cellule dendritiche che si occupano di indurre apoptosi dei linfociti T che sviluppano autoantigeni, macrofagi e fibroblasti (Chi et al. 2021).

## 6. SALUTE INTESTINALE: DEFINIZIONE E MARKER

La salute intestinale è definibile come la capacità dell'intestino di svolgere le sue normali funzioni fisiologiche, di mantenere l'omeostasi e di essere contrastare le patologie infettive e non. La salute intestinale comprende quindi fattori come la capacità d'assorbimento del cibo, una popolazione batterica o microbiota stabile, l'integrità della barriera intestinale, la funzionalità del sistema immunitario e più genericamente la produttività e lo stato di salute generale dell'animale (Kogut, 2017). Questi fattori anatomici, fisiologici e microbiologici compresi all'interno del termine salute intestinale, interagiscono quotidianamente tra di loro per mantenere l'omeostasi. Non bisogna quindi confondere uno stato di buona salute intestinale con l'assenza di malattie, estremamente difficile da ottenere, bensì va inteso come sinonimo di salute animale che garantisce al soggetto di poter esercitare le sue funzioni fisiologiche e raggiungere gli standards di performances richiesti (Kogut, 2017).

Il fattore considerato più importante per la salute intestinale è la capacità digestiva e di assorbimento dei nutrienti, garantita dall'integrità della barriera intestinale. Essa è strutturata per avere un'estesa superficie a contatto con l'esterno (il lume intestinale) grazie alla presenza dei villi intestinali, così da aumentarne la capacità d'assorbimento. Inoltre, le cellule epiteliali sono estremamente adese tra di loro grazie alla presenza di giunzioni strette (tight junctions) che evitano il passaggio di tossine, batteri e enzimi permettendo comunque l'assorbimento dei nutrienti (Kogut 2017).

Un altro fattore estremamente importante è il sistema immunitario locale. Oltre alla presenza delle giunzioni strette, infatti, la parete intestinale è ricoperta da uno strato mucoso, prodotto dalle cellule caliciformi mucipare, che funge da primo ostacolo per la penetrazione dei batteri. Inoltre le cellule di Paneth, localizzate alla base delle cripte, secernono dei peptidi antimicrobici (AMP) come catelicidina, defensina e lectina di tipo C, essenziali nella difesa contro i batteri presenti nel lume.

Sia la difesa immunitaria che l'omeostasi si basano su un sistema immunitario innato, che attraverso i recettori di riconoscimento degli antigeni (PRR - espressi dagli enterociti), le cellule dendritiche della lamina propria, i macrofagi e le citochine infiammatorie, elimina eventuali patogeni e controlla il microbiota, attenuando all'occorrenza la risposta infiammatoria. Grazie ai PRR, inoltre, il sistema immunitario ha la capacità di ignorare gli antigeni espressi dal microbiota e dagli alimenti al fine di mantenere l'omeostasi. Le placche del Peyer, localizzate nella sottomucosa, ospitano i linfociti T, responsabili dell'immunità cellulare, e i linfociti B, deputati alla secrezione di IgA secretorie (Kogut 2017).

Inoltre l'intestino costituisce terreno di crescita per una flora microbica molto complessa detta microbiota. Il microbiota è estremamente importante per la salute intestinale perché interviene nel riciclo dell'urea, nel riassorbimento dell'acqua e nella fermentazione dei carboidrati. Inoltre non solo ostacola la colonizzazione da parte di microrganismi patogeni ma stimola lo sviluppo della risposta immunitaria e, grazie alle fermentazioni microbiche intestinali, fornisce metaboliti come acidi grassi a corta catena (SCFA) e vitamine, per l'ospite. I più comuni SCFA prodotti sono l'acido propionico, l'acido butirrico e l'acido acetico ed è stato ampiamente dimostrato il loro contributo nello sviluppo della morfologia dei villi intestinali, nel miglioramento delle performances di crescita, nella regolazione delle mucine e della risposta immunitaria locale. Nell'intestino dei polli sono stimati essere presenti circa  $10^{14}$  batteri, determinando un microbioma di più di un milione di geni (40-50 volte circa il genoma del pollo). Il microbioma è influenzabile dalla dieta, dagli antibiotici, dalle infezioni, dall'ambiente in cui l'animale vive nonché dalla genetica e dal sesso dell'ospite. La

condizione in cui il cambiamento del microbiota, attraverso la riduzione di batteri tollerati dal sistema immunitario e l'aumentata crescita di eventuali patogeni, porta alla comparsa di malattia, si definisce disbiosi. Non esiste un unico microbiota corretto per la salute intestinale, ma ogni individuo modella in larga parte il proprio microbiota durante il primo periodo di vita (Kogut 2017).

Nei paragrafi successivi verranno trattati in dettaglio il ruolo della morfometria intestinale, delle proteine delle tight junctions, del sistema immunitario, delle mucine e del microbiota come marker per la salute intestinale.

## 6.1 MORFOLOGIA E MORFOMETRIA INTESTINALE

Il singolo strato di cellule epiteliali che riveste il lume intestinale viene continuamente rinnovato dal pool di cellule staminali presenti alla base delle cripte per far fronte al continuo danneggiamento della mucosa da parte di tutti gli elementi presenti nel lume. Durante la migrazione dalla base alla punta dei villi, queste cellule si differenziano acquisendo la capacità di assorbire i nutrienti (Ducatelle et al. 2018).

Una salute intestinale ridotta si manifesta con una morfologia della parete intestinale alterata. La valutazione istologica delle varie porzioni dell'intestino è quindi uno strumento ideale per definire lo stato di salute dell'intestino dell'animale. I reperti che si vanno in genere a valutare sono l'integrità dei villi espressa come densità di quest'ultimi, eventuali alterazioni di forma (allargamento della base, smussamento) e la continuità dello strato epiteliale che li ricopre (El Cafsi et al. 2020). Si valutano inoltre la presenza di infiltrati infiammatori, di iperplasia delle cripte, il numero e la dimensioni di eventuali follicoli nella sottomucosa (iperplasia linfoide) e la presenza di fenomeni emorragici, di necrosi e fibrosi (Yunus et al., 2011).

L'aumentata perdita di cellule epiteliali, correlata a problemi di salute intestinale, porta ad una diminuzione della lunghezza dei villi intestinali, mentre la produzione compensatoria di nuove cellule aumenta la profondità delle cripte. Pertanto le misurazioni della lunghezza dei villi intestinali, della profondità delle cripte, e del rapporto tra i due a livello di duodeno, digiuno e ileo sono diventati il gold standard per la valutazione della salute intestinale. I valori di riferimento nel broiler a 23 giorni in duodeno, digiuno e ileo sono rispettivamente per la lunghezza dei villi intestinali 1400, 900 e 700  $\mu\text{m}$ , per la profondità delle cripte 190, 170 e 160  $\mu\text{m}$  e per il rapporto tra i due 8, 6, 5 (Ducatelle et al. 2018).

Altri parametri utilizzati per la valutazione della salute intestinale sono la larghezza dei villi, associata ad una maggiore salute del villo se aumentata (Ariyadi et al. 2019), e l'area totale di assorbimento della mucosa, calcolata a partire dall'altezza e dalla larghezza dei villi ( $2\pi \times (\text{media larghezza villi}/2) \times \text{media lunghezza villi}$ ) (Wang et al. 2021). Inoltre sono anche utilizzati lo spessore della mucosa e lo spessore della parete muscolare, come valori di ridotta salute intestinale quando assottigliati (Teirlynck et al. 2011).

Per quanto riguarda l'utilizzo di larve di mosca soldato nera, uno studio di Schiavone et al. (2018) ha mostrato che sostituendo l'olio di soia al 50% o al 100% con olio di mosca soldato nera non si evidenziavano effetti sulla morfologia intestinale dei broilers, nonostante sia stato dimostrato in altri studi un ruolo benefico degli acidi grassi a media catena presenti nelle larve nella modulazione immunitaria (Li et al. 2022). Prendendo invece in considerazione l'utilizzo della larva intera, secondo Kawasaki et al. (2019) nelle galline ovaiole l'integrazione al 10% sul mangime giornaliero ingerito (AGM) non ha modificato in alcun modo la morfologia intestinale. Tuttavia secondo Dabbou et al. 2018 l'utilizzo al 15% del tasso di assunzione

giornaliera media dell'alimento (AGM) di farine di HI nel broiler ha determinato un accorciamento dei villi intestinali, un aumento di profondità delle cripte e un rapporto diminuito tra i due, portando a un minor assorbimento dei nutrienti, a una maggiore quantità di energia richiesta per la rigenerazione dell'epitelio e quindi ad un peggioramento delle performances. Questo effetto negativo potrebbe essere dovuto all'indigeribilità della chitina, troppo alta quando le larve rappresentano il 15% della dieta, con conseguente ridotta digeribilità delle proteine e aumentate fermentazioni batteriche dannose per la morfologia dell'intestino. Infatti secondo Bellezza Oddon et al. (2021) somministrando larve vive di *Hermetia illucens* o *Tenebrio molitor* al 5% AGM, non si osservano differenze sulla morfologia intestinale.

## 6.2 GIUNZIONI INTERCELLULARI O TIGHT JUNCTION EPITELIALI

La barriera epiteliale dell'intestino, nata per proteggere l'organismo da patogeni esterni, deve le sue capacità all'adesione presente tra le cellule che la compongono. Questi legami tra le cellule vengono definiti come complessi giunzionali stretti (tight junctions). Le tight junctions devono le loro proprietà a delle glicoproteine di membrana quali caderine, claudine, occludine e zona occludens, che permettono attraverso l'utilizzo di ioni  $Ca^{2+}$  di legare le caderine di due cellule adiacenti che altrimenti con la loro carica negativa si respingerebbero (Zhang et al., 2015).

Le claudine modulano il trasporto paracellulare di anioni e cationi attraverso l'epitelio e svolgono un importante ruolo nella regolazione della segnalazione cellulare. A seconda della tipologia, sigillano o creano pori nell'epitelio, aumentando o diminuendo la permeabilità ai soluti. L'occludina è una proteina con 4 domini trans-membrana dotata della capacità di spostarsi in varie posizioni paracellulari e quindi alterare la permeabilità epiteliale. Tale meccanismo è dimostrato da stress ossidativo e infiammazione che inducono il movimento dell'occludina dalle tight junction alle vescicole citoplasmatiche, con relativa perdita di funzionalità della barriera. Le zona occludens sono localizzate sulla superficie citoplasmatica della membrana cellulare, estremamente vicine ai filamenti delle tight junctions. Possono essere di 3 tipi (ZO-1, ZO-2 e ZO3) e la ZO-1 è considerata uno degli elementi più importanti dei complessi giunzionali stretti in quanto lega il complesso al citoscheletro di actina (Awad et al., 2017).

L'organizzazione strutturale di queste glicoproteine è altamente dinamica, e sia il sistema immunitario che i batteri sono in grado di influenzarla. Infatti macrofagi e cellule M, enterociti specializzati sovrapposti alle placche di Peyer, sono in grado di bypassare questi legami, attraverso l'utilizzo di glicoproteine esposte sulla superficie cellulare, quando catturano gli antigeni luminali e li presentano alle cellule immunitarie sottostanti (Zhang et al., 2015).

Le tight junctions sono inoltre regolate da diversi modulatori intracellulari come la chinasi della catena leggera della miosina (MLCK), la protein-chinasi C (PKC), la protein chinasi attivata dal mitogeno (MAPK) e la GTPasi della famiglia Rho, regolati dai mediatori dell'infiammazione, ma sfruttati anche dai batteri (Awad et al., 2017).

Infatti una serie di importanti patogeni come *S. Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* e *Shigella* spp. sono in grado di dirottare le cellule M affinché li conducano a livello della lamina propria, così come di stimolare le GTPasi della famiglia Rho a interrompere le tight junctions, oppure danneggiarle tramite proteasi o attraverso defosforilazioni o fosforilazioni.

Il danneggiamento delle tight junctions porta ad una condizione patologica definita “permeabilità di membrana”. Un’ aumentata permeabilità di membrana, non sempre si manifesta attraverso segni clinici enterici o sistemici ben evidenti, anzi spesso presenta un decorso sub-clinico. Tuttavia si è vista avere un impatto negativo sulle performances di crescita a causa del minor assorbimento dei nutrienti e del loro direzionamento per la rigenerazione della barriera intestinale (Awad et al., 2017).

Per valutare l’impermeabilità intestinale e quindi indirettamente la salute intestinale è possibile indagare la presenza delle proteine delle giunzioni intercellulari intestinali mediante indagini immunoistochimiche o di immunofluorescenza su sezioni di tessuto intestinale o quantificare attraverso RT-PCR le proteine che costituiscono le tight junctions. Solitamente viene valutata l’espressione delle claudine, delle occludine e della zona occludens (cldn-1, cldn-3, cldn-5, cldn-16, ocl-1, ZO-1 e ZO2) (Awad et al., 2017).

### 6.3 MARKER DEL SISTEMA IMMUNITARIO

Il sistema immunitario intestinale si divide, come quello sistemico, in una risposta immunitaria innata ed una risposta immunitaria acquisita.

Il sistema immunitario innato è in grado di attivarsi efficacemente contro un organismo patogeno anche senza che l’organismo ci sia mai entrato in contatto prima e rappresenta la prima reazione che mette in moto il sistema immunitario contro un patogeno.

In particolare, nella protezione dell’intestino e nel mantenimento dell’omeostasi, i recettori di riconoscimento degli antigeni (PRR), come i Toll-like Receptor 1/2, 2/6, 3, 4,5 e 9 svolgono un ruolo essenziale, differenziando la popolazione commensale da quella patogena. Essi riconoscono gli antigeni molecolari associati ai patogeni (PAMP) e sono in grado di innescare una serie di risposte cellulari trascrizionali e non. I PRR sono presenti sulla superficie cellulare delle cellule appartenenti al sistema immunitario innato di cui fanno parte i peptidi antimicrobici, le cellule fagocitanti (macrofagi e neutrofili) e le cellule natural-killer. Fanno inoltre parte del sistema immunitario innato anche gli interferoni, che ostacolano la replicazione intracellulare virale; le proteine di fase acuta, che inibiscono le sostanze dannose per l’organismo rilasciate dai fagociti e le citochine, peptidi liberati dai fagociti e dalle cellule natural-killer con lo scopo di mediare il processo infiammatorio. In particolare, le citochine si dividono in citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) e citochine anti-infiammatorie (IL4, IL10 e TGF- $\beta$ 4) e sono in grado di indurre la febbre, stimolare il fegato a rilasciare le proteine di fase acuta e reclutare neutrofili e monociti nel sito di attacco microbico.

I PRR e le citochine possono essere quantificati attraverso la Real Time PCR (RT-PCR) per caratterizzare la risposta immunitaria innata messa in atto a livello intestinale e quindi valutare la salute intestinale. Pitargue et al. (2019) hanno usato le citochine come marker per valutare gli effetti della somministrazione di vitamine E sulle performances e sulla salute intestinale dei broiler. Hu et al. (2018) hanno sempre usato le citochine per dimostrare come l’integrazione di 50 mg/kg di chitosano (prodotto di deacetilazione della chitina) nella dieta giornaliera di suini all’ingrasso, abbia ridotto l’espressione delle citochine pro-infiammatorie senza influenzare quelle anti-infiammatorie.

In un secondo momento interviene la risposta immunitaria acquisita, che si sviluppa dopo la nascita ed è in grado di sviluppare una memoria dei patogeni, innescando una serie di reazioni estremamente mirate verso l'antigene patogeno attraverso i linfociti, (Sjaastad e Hove 2013). L'iperplasia linfoide rappresenta una reazione immunitaria locale come risposta all'irritazione cronica della mucosa da parte della presenza continua di antigeni virali e batterici ma anche di natura alimentare. Questa si manifesta come un ingrandimento dei follicoli presenti in mucosa e sottomucosa, che variano l'uno dall'altro per forma e dimensioni e può essere visualizzata ad un esame microscopico e usata come marker di valutazione (Elkholy et al., 2017). Inoltre, la produzione di immunoglobuline A da parte dei linfociti può essere anch'essa quantificata ed usata come marker di salute intestinale (Ducatelle et al., 2018).

#### 6.4 LE MUCINE INTESTINALI

Il muco intestinale rappresenta la prima barriera tra il lume intestinale e la mucosa. È meno pronunciato nel piccolo intestino, dove protegge l'apertura delle cripte e la base dei villi intestinali. Nel colon, invece, forma uno strato spesso caratterizzato da una parte più interna che ostacola la penetrazione dei batteri e una meno densa più esterna che fornisce un substrato di crescita ideale ai batteri commensali che compongono il microbiota. La composizione del muco gioca un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi, interagendo con il microbiota e influenzandosi a vicenda secondo meccanismi dati dall'immunità innata dell'individuo (Deplancke e Gaskins, 2001). Le proprietà viscosive e protettive sono date principalmente dalla glicoproteina chiamata mucina, dotata di uno scheletro peptidico sulla quale si inseriscono, tramite delle o-glicosilazioni, degli oligosaccaridi tra cui la N-acetilglucosamina, la N-acetilgalattosamina, il fucosio e il galattosio. Le catene di oligosaccaridi terminano spesso con un gruppo solfato o una molecola di acido sialico, che determinano la natura polianionica e il pH neutro della mucina. Questa struttura garantisce alla mucina resistenza verso l'azione di glicosidasi, proteasi ed enzimi proteolitici oltre che donarle la capacità di trattenere l'acqua. Le mucine sono classificabili in neutre ed acide, a loro volta suddivisibili in acide solfate (sulfomucine) e acide sialilate (sialomucine). Le mucine neutre e le sialomucine acide svolgono un ruolo protettivo nei confronti dei patogeni enterici, ostacolando la degradazione del muco da parte di quest'ultimi e facilitando la disgregazione dei carboidrati complessi. Al contrario le sulfomucine sono soprattutto espresse da cellule caliciformi immature (Forder et al., 2007)

Le mucine sono secrete tramite esocitosi dalla superficie apicale di cellule epiteliali colonnari specializzate presenti lungo i villi e nelle cripte, chiamate "caliciformi mucipare". L'esocitosi può avvenire come secrezione fisiologica in basse quantità con meccanismi di regolazione sconosciuti con lo scopo di mantenere lo spessore dello strato mucosale, costantemente esposto a acidi, agenti irritanti e movimenti peristaltici. Allo stesso modo, l'esocitosi può essere regolata da un'ampia gamma di ormoni, neuropeptidi e mediatori dell'infiammazione (citochine e lipidi), che entrano in gioco quando sono coinvolti agenti patogeni come batteri ad azione mucolitica (Dharmani et al. 2009).

Per il loro ruolo nel mantenimento della salute intestinale le mucine sono quantificate attraverso indagini biomolecolari (RT-PCR). Una delle mucine più espresse è la MUC2 e la sua importanza è stata dimostrata da Sluis et al. (2006) in topi carenti di MUC2, che nel tempo sono andati spontaneamente incontro a colite.

Nel broiler secondo Biasato et al. (2020), la distribuzione delle mucine aumenterebbe lungo l'asse duodeno-ileale per raggiungere il suo apice appunto a livello dell'ileo, la regione più frequentemente colonizzata dai batteri e quindi quella più bisognosa di protezione.

Sempre secondo Biasato et al. (2020) la somministrazione di farina di mosca soldato nera al 10% e al 15% AGM causerebbe una diminuzione nell'intensità delle mucine rispetto alla normale dieta di un broiler. Questo dato potrebbe essere spiegato dall'indigeribilità della chitina, che porterebbe ad una stasi e fermentazione delle proteine con crescita di specie batteriche ad azione mucolitica come *Helicobacter*. Tuttavia nei polli a cui è stata fornita farina di HI al 5% AGM si è invece vista una maggiore intensità di mucine a livello dei villi intestinali. L'unico studio sulla somministrazione di larve vive di *Hermetia illucens* nei broiler è quello di Colombino et al. (2021) che non ha notato differenze rispetto alla dieta a base di soia. Tuttavia in quest'ultimo studio era stato fornito solo il 5% in larve vive, quantità inferiore se paragonata al 5% in farina dello studio di Biasato et al. (2020).

## 6.5 MICROBIOTA NEL POLLO

Lo studio del microbiota nel pollo generalmente avviene a livello del cieco che ospita la maggiore densità e varietà di microrganismi, a causa della prolungata presenza della digesta, superiore a quella degli altri tratti intestinali. Nonostante non esista un unico microbiota valido per una buona salute intestinale, generalmente, in un cieco sano predominano i phyla Firmicutes e Bacteroidetes, seguiti dai Proteobacteria (Oakley et al., 2014). Il phylum Proteobacteria comprende molte specie patogene come *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholera*, *Campylobacter spp* e *Helicobacter spp.*, meno presenti in un cieco sano rispetto a *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* (appartenenti al phylum Firmicutes), *Bacteroides*, (appartenente al phylum Bacteroidetes), e in minor misura *Alistipes* (Bacteroidetes) e *Faecalibacterium* (Firmicutes), correlati invece a buone performances di crescita (Diaz Carrasco et al., 2019).

I probiotici sono generalmente lo strumento più utilizzato per influenzare la salute intestinale, cioè microrganismi che colonizzando l'intestino che possono favorire la produzione di peptidi antimicrobici e la produzione di acidi grassi a corta catena. Essi sono spesso associati con i prebiotici, cioè substrati favorevoli alla crescita di questi microrganismi. In questo contesto sono risultati di interesse anche lo studio di insetti vivi a basse dosi (Colombino, 2021).

In particolare, la somministrazione al 5% di larve vive di *Hermetia illucens* a polli broiler in allevamento intensivo si è dimostrata capace di modulare il microbiota cecale, senza alterare gli altri parametri relativi alla salute intestinale. Tali polli hanno mostrato una predominanza nel microbiota cecale di *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Barnesiella* (appartenente ai Bacteroidetes), *Helicobacter* e *Phascolarctobacterium* (appartenente ai Firmicutes). Sia *Bacteroides* che *Helicobacter* in basse quantità sembrano avere effetti positivi sulla produzione di acidi grassi a corta catena, importanti per la loro attività anti-ossidante, anti-infiammatoria e come substrato per la crescita degli enterociti. Tuttavia, alte quantità di *Helicobacter*, possibilmente causate da un'eccessiva quantità di chitina nella dieta, possono avere effetti negativi a causa della sua azione mucolitica.

Inoltre è stata vista una maggiore presenza di *Clostridium*, *Eubacterium*, *Saccharibacteria* e batteri appartenenti alla famiglia Victivillaceae, rispetto ai polli alimentati con farina di soia. *Clostridium* e *Eubacterium* sono batteri produttori di acidi grassi a corta catena, mentre la

famiglia Victivillaceae mai isolata nel pollo, sembra svolgere un ruolo positivo nella fermentazione dei polisaccaridi nell'uomo. Questo studio sembra supportare l'ipotesi secondo cui la somministrazione in basse quantità di insetti vivi può avere effetti positivi per la salute intestinale mentre alte quantità possono portare alla crescita di batteri ad azione mucolitica e alla riduzione di quelli produttori di acidi grassi a corta catena per la presenza di eccessiva chitina indigeribile (Biasato et al.; 2019). Tuttavia, non è ancora stato chiarito il coinvolgimento della composizione del microbiota larvale, variabile in base al substrato utilizzato, nel determinare il microbiota del pollo (Colombino et al. 2021).

## 6.6 ULTERIORI MARKER DELLA SALUTE ANIMALE

Ad integrazione dei marker sopra riportati volti ad indagare la salute intestinale, l'utilizzo di mangimi supplementari o integratori dietetici rende necessaria anche la valutazione della salute animale in particolare attraverso il monitoraggio della morfologia di organi coinvolti nelle detossificazioni quali il fegato e dei principali organi linfoidi (milza, timo e borsa di Fabrizio) al fine di escludere risposte infiammatorie/immunologiche sistemiche.

Nel fegato vanno pertanto considerati sia i fenomeni degenerativi sia quelli infiammatori. In particolare, studi già condotti utilizzando farine o larve di insetto (Biasato et al., 2016; Bellezza Oddon et al., 2021) hanno preso in considerazione la presenza di aggregati linfoidi/infiltrati infiammatori perivasali così come il livello di degenerazione vacuolare epatica.

Per quanto riguarda la milza sono stati considerati il numero e la dimensione dei follicoli, gli eventuali fenomeni di iperplasia della polpa bianca, così come il numero di apoptosi in eventuali fenomeni di deplezione della polpa bianca.

Per il timo si è valutata un eventuale deplezione corticale prendendo in considerazione il rapporto tra la quantità di corticale e midollare. Per la borsa di Fabrizio si è valutata la deplezione dei follicoli così come la presenza di cisti intrafollicolari.

## **7. SCOPO DEL LAVORO**

L'obiettivo di questa tesi è stato valutare l'effetto dell'integrazione di larve vive di *Hermetia illucens* nella dieta di polli allevati in allevamento biologico sulle performances di crescita e sulla salute intestinale e generale dell'animale. In particolare l'attenzione si è focalizzata sulla morfologia e morfometria intestinale, sull'espressione della mucina e sulla presenza di alterazioni morfologiche in fegato, milza e borsa di Fabrizio.

## 8. MATERIALI E METODI

### 8.1 ANIMALI E DIETA

Il seguente protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Torino.

Un totale di 240 polli a collo nudo di 20 giorni di età è stato comprato da un allevamento e trasferito al Centro per la Conservazione delle Risorse Genetiche Avicole Locali dell'Università di Torino. I pulcini sono stati previamente sessati per avere un numero uguale di maschi e femmine. La prova è stata condotta tra ottobre e dicembre 2021 e il peso medio iniziale dei polli era di 512.02 g per i maschi e 435.94 g per le femmine. I polli sono stati collocati in 24 box dopo essere stati pesati singolarmente e distribuiti affinché il peso medio di ogni box fosse più simile possibile al peso medio iniziale totale. Successivamente i box sono stati divisi in 4 gruppi sperimentali a seconda di sesso e dieta (6 repliche/trattamento, 10 polli/replica):

1. maschi alimentati con dieta standard a base di soia: gruppo controllo maschi (CM)
2. maschi alimentati con dieta standard + 10% del tasso di ingestione giornaliera di larve vive di mosca soldato nera: gruppo trattati maschi (LM)
3. femmine alimentate con dieta standard a base di soia: gruppo controllo femmine (CF)
4. femmine alimentate con dieta standard + 10% del tasso di ingestione giornaliera di larve vive di mosca soldato nera: gruppo trattate femmine (LF)

I polli hanno sempre avuto accesso ad acqua fresca e pulita e alla dieta standard. Fino a 35 giorni di età è stato somministrato un mangime contenente il 22.92 % di proteina grezza, 6.19 % di grassi grezzi e 18.73 MJ/kg di energia lorda (mangime primo periodo, **Figura 5A**), Successivamente, dai 35 agli 82 giorni di età, è stato somministrato un mangime contenente il 20.52 % di proteina grezza, 5.12 % di grasso grezzo e 18.61 MJ/Kg di energia lorda (mangime secondo periodo, **Figura 5B**). La composizione, simile per entrambi i mangimi prodotti da Verzuolo Biomangimi s.r.l., era caratterizzata da mais, farina di soia, piselli, glutine di mais e farina di erba medica come principali ingredienti e fonti di proteine. I restanti ingredienti erano rappresentati da fosfato dicalcico, carbonato di calcio, olio di soia, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio e farina di patate. Le larve sono state somministrate ai gruppi trattati tutti i giorni in un piatto apposito. Per evitare bias legati alla curiosità suscitata dall'ingresso di persone nel box e alla presenza del piatto, ai controlli è stato presentato un piatto vuoto.

Durante l'intera durata della prova sono stati garantiti ventilazione e fotoperiodo naturale (12 ore di luce:12 ore di buio a ottobre, e 10 ore di luce:14 ore di buio a dicembre). A partire dai 49 giorni di età, è stato garantito a tutti i polli l'accesso all'esterno fino alla fine della prova.

**Figura 5.** Cartellini dei mangimi usati per la dieta standard: Cartellino A (per il primo periodo) e Cartellino B (per il secondo periodo).




A

Abello FIN-IMM s.r.l.  
Via Provinciale Saluzzo 94 12039 VERZUOLO (CN)  
STABILIMENTO Via Sottana 50 VERZUOLO (CN)  
Tel 0175/87808 Fax 0175/88931

Iscrizione registro imprese 01998310047  
Capitale sociale € 10.400  
e-mail: info@verzuolobiomangimi.it  
www.verzuolobiomangimi.it

A034b

**MANGIME COMPLETO PER POLLI DA INGRASSO  
POLLO UNO**

*Può essere utilizzato in agricoltura biologica conformemente ai regolamenti: (CE) 834/07 e (CE) 889/08*

**Composizione:**  
\*granturco, \*\*farina di soia, \*pannello di girasole, \*piselli, glutine di mais, \*farina di erba medica, fosfato bicalcico, carbonato di calcio, \*\*olio di soia, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio, fecola di patate.  
**\*da agricoltura biologica \*\*in conversione all'agricoltura biologica**

<b>Componenti analitici per Kg</b>		<b>Dati in % sulla sostanza secca</b>		
Fibra grezza	5,85 %	Metionina	3,72 g s.s. biologica	70,0 %
Ceneri grezze	7,81 %	Fosforo	7,10 g s.s. in conversione	21,5 %
Proteina grezza	22,92 %	Calcio	14,10 g s.s. convenzionale	3,5 %
Grassi grezzi	6,19 %	Sodio	1,98 g s.s. origine agricola	94,9 %
Umidità	9,56 %		s.s. non agricola	5,1 %
Lisina	11,47 g			




B

Abello FIN-IMM s.r.l.  
Via Provinciale Saluzzo 94 12039 VERZUOLO (CN)  
STABILIMENTO Via Sottana 50 VERZUOLO (CN)  
Tel 0175/87808 Fax 0175/88931

Iscrizione registro imprese 01998310047  
Capitale sociale € 10.400  
e-mail: info@verzuolobiomangimi.it  
www.verzuolobiomangimi.it

A035c

**MANGIME COMPLETO PER POLLI DA INGRASSO  
POLLO PLUS**

*Può essere utilizzato in agricoltura biologica conformemente ai regolamenti: (CE) 834/07 e (CE) 889/08*

**Composizione:**  
\*granturco, \*farina di soia, \*\*pannello di girasole, \*piselli, glutine di mais, \*farina di erba medica, carbonato di calcio, fosfato bicalcico, cloruro di sodio, bicarbonato di sodio.  
**\*da agricoltura biologica \*\*in conversione all'agricoltura biologica**

<b>Componenti analitici per Kg</b>		<b>Dati in % sulla sostanza secca</b>		
Fibra grezza	6,26 %	Metionina	3,60 g s.s. biologica	76,8 %
Ceneri grezze	6,22 %	Fosforo	5,36 g s.s. in conversione	14,8 %
Proteina grezza	20,52 %	Calcio	10,65 g s.s. convenzionale	4,7 %
Grassi grezzi	5,12 %	Sodio	1,71 g s.s. origine agricola	96,3 %
Umidità	9,90 %		s.s. non agricola	3,7 %
Lisina	9,16 g			

## 8.2 PERFORMANCES DI CRESCITA

La mortalità e lo stato di salute dei polli è stato monitorato giornalmente. Gli animali sono stati pesati settimanalmente e si è calcolato il peso medio (PM). È stato registrato anche il consumo di mangime e sono stati calcolati l'Indice di Conversione Alimentare (ICA) e l'assunzione media giornaliera di mangime (AGM) al termine di ogni periodo di dieta (20-35 giorni di età, 35-82 giorni di età) e al termine della prova (20-82 giorni di età). L'ICA nel gruppo dei trattati è stato corretto sulla base del quantitativo di larve assunte su sostanza secca.

## 8.3 PROCEDURE DI MACELLAZIONE

A 81 giorni di età, tutti gli animali sono stati pesati individualmente e successivamente sottoposti a 12 ore di digiuno prima della macellazione avvenuta a 82 giorni. In base al peso vivo, sono stati selezionati 12 animali per trattamento (2 animali per replica) da sottoporre a macellazione previo stordimento elettrico e dissanguamento, seguito da decapitazione ed eviscerazione.

## 8.4 CARATTERISTICHE DELLA CARCASSA

In sede di macellazione, le carcasse spiumate ed eviscerate, private di testa, collo, piedi e grasso addominale, sono state poi pesate a caldo (PCC) e refrigerate per 24 ore a 4°C per registrare il peso della carcassa a freddo (PCF).

Il peso della milza, del fegato, della borsa di Fabrizio, del cuore, del polmone, del proventriglio, del ventriglio e del grasso addominale sono stati registrati immediatamente al termine della macellazione. Le carcasse sono state poi dissezionate e sono state prelevate separatamente le cosce per sottoporle a pesatura.

## 8.5 ANALISI ISTOMORFOMETRICHE

Per ogni trattamento dietetico, 12 animali sono stati sottoposti a valutazione istomorfometrica. Alla macellazione sono stati prelevati campioni di duodeno (ansa duodenale), digiuno (tratto precedente il diverticolo di Meckel) ed ileo (tratto precedente la giunzione ileo-cieco-colica), lavati con soluzione salina allo 0.9% per rimuovere il contenuto e fissati in formalina tamponata al 10%. Una volta completata la fissazione sono stati dimensionati, orientati e, quindi, inclusi in paraffina. Con il microtomo si è proceduto poi all'allestimento di 3 sezioni istologiche (una per ciascun tratto intestinale) per individuo, che sono state colorate con Ematossilina-eosina ed esaminate al microscopio ottico. Per ogni sezione è stata effettuata una foto mediante software NIS-Element F, utilizzando una macchina fotografica digitale Nikon DS-Fi1 collegata ad un microscopio Zeiss Axiophoto con un obiettivo da 2.5x. Sulle fotografie sono state quindi eseguite le analisi morfometriche utilizzando il programma Image®-Pro Plus. Gli indici morfometrici valutati comprendono l'altezza dei villi intestinali (Vh, dall'apice del villo fino alla cripta), la larghezza dei villi intestinali (Vw, presa ad altezza metà villo), la profondità delle cripte (Cd, dalla base del villo fino alla sottomucosa), lo spessore totale della mucosa (dall'apice del villo fino alla sottomucosa) e lo spessore dello

strato muscolare (dal termine della sottomucosa fino alla sierosa) come indicato nei lavori di Wang et al. (2021), Teirlynck et al. (2011) e Biasato et al. (2020). Successivamente si è calcolata l'area totale di assorbimento della mucosa a partire dall'altezza e dalla larghezza dei villi e il rapporto altezza del villo/profondità delle cripte ( $Vh/Cd$ ) come indicato nei lavori di Wang et al. (2021) (**Figura 6**).

Le misure morfometriche sono state effettuate su 10 villi intatti e correttamente orientati e su 10 cripte per ogni tratto intestinale. Per quanto riguarda lo spessore di mucosa e muscolare sono stati selezionati 3 punti intatti, privi di spazi vuoti tra i vari strati.

Dagli stessi 12 animali sono anche stati prelevati campioni di fegato, milza e borsa di Fabrizio e processati come già descritto per i segmenti intestinali. Le sezioni istologiche di duodeno, digiuno, ileo, fegato, milza e borsa di Fabrizio sono state infine esaminate al microscopio ottico per valutare l'eventuale presenza di lesioni istopatologiche, utilizzando una scala di valutazione semi-quantitativa: assenti (0), lievi (1), moderate (2), gravi (3). Il punteggio è stato assegnato valutando i seguenti parametri:

- Tratti dell'intestino: integrità dei villi, eventuali alterazioni di forma (allargamento della base, smussamento), continuità dello strato epiteliale che li ricopre, presenza di infiltrati infiammatori, numero e dimensioni di eventuali follicoli nella sottomucosa (iperplasia linfoide) e presenza di emorragie, necrosi e fibrosi;
- Fegato: presenza di degenerazione vacuolare e infiammazione linfoplasmocellulare;
- Milza: numero e dimensione dei follicoli, eventuali fenomeni di iperplasia o deplezione della polpa bianca;
- Borsa di Fabrizio: grado di deplezione dei follicoli e numero di cisti intrafollicolari.

**Figura 6.** Analisi morfometriche del piccolo intestino;  $Vh$ =altezza del villo;  $Vw$ = larghezza del villo;  $Cd$ =profondità della cripta (Ematossilina-eosina, 2.5x)



## 8.6 ESPRESSIONE GENICA DELLA MUCINA

In sede di macellazione il digiuno è stato prelevato sterilmente da 12 animali per trattamento, lavato con soluzione salina allo 0.9% e stoccato in RNA later per 24 ore a 4°C. Successivamente l'RNA later è stato rimosso e i campioni stoccati a -80°C per la successiva valutazione dell'espressione della MUC-2. Per l'esecuzione delle analisi sono stati pesati 150 mg di campione ed è stato estratto l'RNA totale da ciascun campione utilizzando il TRIzol secondo le istruzioni indicate dal produttore (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e riassunte di seguito:

- 1) Omogenizzare il campione con 1.5 ml di Trizol.
- 2) Dopo l'omogenizzazione, prelevare il surnatante e centrifugare l'omogenato a 12.000 g per 10 minuti a 2-8 °C.
- 3) Traferire il surnatante in una nuova eppendorf da 2 ml.
- 4) Lasciare i campioni 5 minuti a temperatura ambiente sotto cappa.
- 5) Aggiungere 0.3 ml di cloroformio e agitare vigorosamente l'eppendorf per 15 secondi
- 6) Lasciare i campioni a temperatura ambiente sotto cappa per 2-15 minuti.
- 7) Centrifugare a 12.000 g per 15 minuti a 2-8°C. Il centrifugato si separa in 3 fasi: una fase organica rossa (contiene proteine), un'interfase (contiene DNA), una fase acquosa superiore incolore (contiene RNA).
- 8) Trasferire la fase acquosa in una nuova eppendorf da 2 ml e aggiungere 0.75 mL di isopropanolo alla fase acquosa.
- 9) Lasciare il campione a temperatura ambiente sotto cappa per 5-10 minuti
- 10) Centrifugare per 10 minuti a 12.000 × g a 4 °C. Il precipitato di RNA totale forma un pellet bianco all'estremità della provetta.
- 11) Scartare il surnatante con una micropipetta.
- 12) Risospendere il pellet in 1.5 mL di etanolo al 75%
- 13) Vortexare il campione e quindi centrifugare per 5 minuti a 7500 × g a 4° C.
- 14) Scartare il surnatante con una micropipetta.
- 15) Asciugare all'aria il pellet di RNA
- 16) Risospendere il pellet in 50 µl di acqua priva di RNasi.

La qualità dell'estratto è stata poi valutata utilizzando lo spettrofotometro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wington, DE, USA), verificando che il rapporto OD260:OD280 fosse compreso tra 1.7 e 2.1. L'assorbanza a 260 nm fornisce il contenuto totale di acido nucleico, mentre l'assorbanza a 280 nm determina la purezza del campione.

Successivamente, in accordo con Colombino et al. (2021), 2 µg di RNA totale di ciascun campione sono stati retrotrascritti in cDNA usando il kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) secondo il seguente protocollo di reazione:

- 1) Fase di priming: 5 minuti a 25°C,
- 2) Fase di retrotrascrizione: 20 minuti a 46°C,
- 3) Fase di inattivazione della trascrittasi inversa: 1 minuto a 95°C.

Il cDNA è stato poi stoccato a -20°C.

La rt-qPCR è stata effettuata usando lo strumento "7500 Real Time PCR system" (Applied Biosystems, Waltham, MA) in una reazione da 20 µL contenente 2 µL cDNA, 10 µL di SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) e 0.1 µL di forward e reverse primers (40 mM) del gene MUC-2 (F:5'-ACTCCTCCTTTGTATGCGTGA-3'; R:5'-GTTAACGCTGCATTCAACCTT-3'). La rt-qPCR è stata effettuata con le seguenti modalità:

- 1) Incubazione iniziale a 95°C per 30 s;

2) 40 cicli di denaturazione a 95°C per 15 s

3) Annealing/estensione a 60°C per 60 s.

Ogni reazione è stata effettuata in triplicato. I risultati ottenuti sono stati normalizzati per due geni di referenza, la B-actina (F:5'-GAGAAATTGTGCGTGACATCA-3'; R:5'-CCTGAACCTCTCATTGCCA-3') e il GADPH (F:5'-GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT-3'; R:5'-ACCTCTGTCATCTCTCCACA-3'). L'efficienza dei primers è stata valutata con la creazione di curve standard con diluizioni scalari in base 10. Un'efficienza tra 90 e 110% con un coefficiente di correlazione (R2) di 0.99 è stata considerata adeguata.

## 8.7. ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica dei dati relativi alle performance di crescita, alle caratteristiche della carcassa, alla valutazione istopatologica degli organi e alle analisi morfometriche degli intestini è stato utilizzato il software R studio versione 4.0.4 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.r-project.org>). Per valutare se i dati seguivano una distribuzione normale o non normale si è utilizzato il test di Shapiro-Wilk. I dati relativi alle performance di crescita e alle caratteristiche della carcassa sono stati sottoposti a test di Levene per valutare l'omogeneità delle varianze campionarie. Se l'ipotesi nulla era rifiutata (quindi F11), i dati sono stati sottoposti a test non parametrico di Brown-Forsythe per testare se le medie di ciascun gruppo erano significativamente diverse. L'unità sperimentale è costituita da un gruppo di animali per le performance di crescita e da un singolo soggetto per le caratteristiche della carcassa. Le performances di crescita, le caratteristiche della carcassa e gli score di intestino, milza, fegato e borsa di Fabrizio sono stati analizzati con un test ANOVA robusto. Il modello fa sì che le variabili risposta dipendano da tre fattori fissi (dieta, sesso e segmento intestinale). Le interazioni tra i fattori fissi sono state valutate con confronti uno a uno robusti.

Gli indici morfometrici sono stati analizzati utilizzando un test ANOVA robusto (pacchetto R: walrus). Il modello fa sì che gli indici morfometrici dipendano da tre fattori fissi (dieta, sesso e segmento intestinale). Le interazioni tra i fattori fissi sono state valutate con confronti uno a uno robusti.

Per quanto riguarda i dati relativi alla PCR, Microsoft Excel è stato utilizzato per convertire i valori di Ct ottenuti in unità lineari chiamate "espressione relativa normalizzata" in accordo con quanto riportato da Taylor et al. (2019). I campioni con un'espressione relativa normalizzata superiore a 10 sono stati considerati outliers. È stato effettuato un test ANOVA robusto con le modalità sopra descritte per performances di crescita, caratteristiche della carcassa e score istopatologici seguito da confronti uno a uno robusti.

Tutti i risultati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard della media (SEM) o come mediana e range interquartile (IR) a seconda della distribuzione dei dati. I valori di  $P < 0.05$  sono stati considerati statisticamente significativi. Valori di  $P < 0.10$  sono stati considerati trend statistici.

## 9. RISULTATI

### 9.1 PERFORMANCES DI CRESCITA

Gli effetti della dieta, del sesso e della loro interazione sulle performances di crescita dei polli sono visibili nel dettaglio nelle **Tabelle 3 e 4**.

Complessivamente, le performances di crescita non sono state influenzate dalla dieta ( $P>0.05$ ). I gruppi di controllo (C) e quelli trattati (L) appartenenti allo stesso sesso hanno, infatti, ottenuto curve di accrescimento simili. Tuttavia, nel primo periodo (28-35 giorni) i gruppi che hanno ricevuto le larve vive hanno mostrato un ICA migliore rispetto ai controlli ( $P=0.001$ ).

Tra i maschi e le femmine si sono registrate delle differenze significative in ciascuno dei 3 periodi considerati (1°, 2°, e intera prova). Infatti i maschi hanno mostrato PM, IGM e AGM maggiori delle femmine in tutti e 3 i periodi ( $P<0.001$ ). Hanno inoltre mostrato ICA migliori rispetto alle femmine nel 2° periodo e nel periodo dell'intera prova ( $P<0.001$ ).

L'interazione tra la dieta e il sesso ha avuto un effetto significativo solo per le ICA del 1° e del 2° periodo. Nel 1° periodo gli LM hanno avuto ICA migliori dei CM, mentre nel 2° periodo le LF hanno avuto ICA maggiori delle CF ( $P=0.043$  e  $P=0.013$ , rispettivamente), aspetto che si è osservato anche nell'intero periodo come trend statistico ( $P=0.080$ ).

**Tabella 3.** Effetti della dieta e del sesso sulle performances di crescita dei polli del presente studio (n=12 polli /trattamento).

Valore	Giorni di Età	Dieta (D)		SEM	Sesso (S)		SEM	P-value	
		C	L		F	M		D	S
PM g	28	473.59	477.72	1.99	439.30	515.02	1,99	0.142	<0.001
	35	680.02	689.01	4.11	618.74	757.25	4.13	0.122	<0.001
	81	2310.04	2339.71	12.69	1970.96	2742.23	12.91	0.098	<0.001
IGM g/d	28-35	29.90	30.65	0.36	26.49	34.59	0.36	0.137	<0.001
	35-81	35.39	35.66	0.28	29.40	42.93	0.29	0.498	<0.001
	28-81	34.61	35.00	0.25	28.96	41.83	0.25	0.272	<0.001
AGM g/d	28-35	63.26	61.63	0.71	54.98	70.91	0.72	0.107	<0.001
	35-81	118.98	122.24	1.24	107.04	135.87	1.24	0.062	<0.001
	28-81	111.77	113.31	0.98	99.29	127.55	0.99	0.267	<0.001
ICA g/g	21-35	2.09	2.01	0.02	2.06	2.03	0.02	0.001	0.211
	35-81	3.34	3.37	0.02	3.60	3.12	0.02	0.374	<0.001
	21-81	3.19	3.21	0.02	3.42	3.00	0.02	0.750	<0.001

Abbreviazioni: PM, Peso medio; IGM, incremento giornaliero medio; AGM, assunzione giornaliera media di mangime; ICA, Indice di conversione alimentare; SEM, errore standard della media; F= gruppo femmine; M=gruppo maschi; C=gruppo controllo; L=gruppo larve.

**Tabella 4.** Effetti dell'interazione tra la dieta e il sesso sulle performances di crescita dei polli del presente studio (n = 12 polli/trattamento).

Valore	Giorni di età	Sesso*Dieta				SEM	P-value
		CF	CM	LF	LM		
PM g	21	435.86	514.60	442.77	515.43	2.81	0.232
	35	617.49	748.88	620.00	765.71	5.81	0.285
	81	1963.61	2717.59	1978.34	2767.09	18.25	0.493
IGM g/d	28-35	26.71 <sup>cd</sup>	33.47 <sup>b</sup>	26.28 <sup>d</sup>	35.75 <sup>a</sup>	0.51	0.140
	35-81	29.26	42.80	29.53	43.06	0.41	0.899
	28-81	28.83	41.57	29.10	42.10	0.36	0.862
AGM g/d	28-35	56.18	71.24	53.81	70.59	1.02	0.296
	35-81	104.18 <sup>c</sup>	135.88 <sup>a</sup>	109.99 <sup>b</sup>	135.87 <sup>a</sup>	1.76	0.061
	28-81	97.98	127.51	100.63	127.59	1.39	0.291
ICA g/g	21-35	2.08 <sup>a</sup>	2.10 <sup>a</sup>	2.05 <sup>a</sup>	1.97 <sup>b</sup>	0.02	0.043
	35-81	3.54 <sup>b</sup>	3.14 <sup>c</sup>	3.66 <sup>a</sup>	3.10 <sup>c</sup>	0.41	0.013
	21-81	3.37 <sup>b</sup>	3.04 <sup>c</sup>	3.47 <sup>a</sup>	2.97 <sup>c</sup>	3.21	0.080

Le lettere a e b riportate in apice identificano differenze statisticamente significative tra i vari gruppi per gli organi considerati ( $P < 0.05$ ).

Abbreviazioni: PM, Peso medio; IMG, incremento giornaliero medio; AGM, assunzione giornaliera media di mangime; ICA, Indice di conversione alimentare; SEM, errore standard della media; CF=femmine del controllo; CM=maschi del controllo; LF=femmine del gruppo larve; LM=maschi del gruppo larve.

## 9.2 CARATTERISTICHE DELLA CARCASSA

Gli effetti della dieta, del sesso e della loro interazione sulle caratteristiche della carcassa dei polli sono visibili nelle **Tabelle 5 e 6**.

Se non si sono registrate differenze legate alla dieta per il peso vivo, il peso a caldo, il peso della carcassa a freddo e il peso della carcassa ready-to-eat tra C e L ( $P>0.05$ ), il peso percentuale della milza sul peso vivo era maggiore in L rispetto a C ( $P=0.002$ ).

Al contrario, il sesso ha influenzato significativamente il peso vivo, il peso della carcassa fredda e il peso della carcassa ready -to-eat, i quali hanno mostrato valori maggiori nei maschi che nelle femmine ( $P<0.001$ ).

Il peso percentuale dei polmoni e del grasso addominale sul peso vivo si è rivelato essere influenzato dal sesso, essendo maggiore nelle femmine rispetto ai maschi ( $P<0.001$ ). Il peso percentuale della coscia e del cuore sul peso vivo si è rilevato, invece, essere maggiore nei maschi che nelle femmine ( $P<0.001$ ).

Per quanto riguarda l'interazione tra sesso e dieta questa ha influenzato il peso percentuale della borsa di Fabrizio ( $P=0.020$ ). Nello specifico il gruppo LF ha mostrato un maggiore peso della borsa di Fabrizio rispetto ai gruppi CF e LM.

**Tabella 5.** Effetti della dieta e del sesso sulle caratteristiche della carcassa dei polli del presente studio (n=12 polli/trattamento)

Valore	Dieta		SEM	Sesso		SEM	P-value	
	C	L		F	M		Dieta	Sesso
Peso vivo (g)	2423.78	2441.68	10.00	2035.78	2829.69	10.00	0.206	<0.001
Peso CF (g)	1570.91	1592.90	7.93	1315.63	1848.18	7.93	0.050	<0.001
CF (%PV)	64.73	65.23	0.28	64.64	65.32	0.28	0.213	0.091
Peso RTE (g)	1595.57	1617.23	8.52	1336.55	1876.24	8.52	0.072	<0.001
RTE (%PV)	65.75	66.23	0.30	65.67	66.31	0.30	0.256	0.132
Polmoni (%CF)	23.27	23.20	0.21	24.25	22.22	0.21	0.815	<0.001
Coscia (%CF)	34.00	33.90	0.20	33.10	34.81	0.20	0.700	<0.001
Milza (%PV)	0.14	0.16	0.00	0.15	0.14	0.00	0.002	0.150
Borsa di Fabrizio (%PV)	0.21	0.22	0.01	0.23	0.21	0.01	0.619	0.224
Fegato (%PV)	1.85	1.87	0.04	1.90	1.81	0.04	0.739	0.87
Cuore (%PV)	0.48	0.51	0.01	0.47	0.52	0.01	0.057	0.001
Proventriglio (%PV)	0.36	0.35	0.01	0.36	0.35	0.01	0.410	0.747
Ventriglio (%PV)	3.49	3.51	0.10	3.57	3.43	0.10	0.922	0.329
Grasso Addominale (%PV)	1.60	1.43	0.18	2.02	1.01	0.18	0.511	<0.001

*Abbreviazioni: CC: carcassa a caldo; CF, carcassa fredda; PV, peso vivo; RTE, ready to eat; SEM, errore standard della media; F= gruppo femmine; M=gruppo maschi; C=gruppo controllo; L=gruppo larve.*

**Tabella 6.** Effetti dell'interazione tra dieta e sesso sulle caratteristiche della carcassa dei polli del seguente studio (n=12 polli/trattamento)

Valore	Sesso*Dieta				SEM	P-value
	CF	CM	LF	LM		
Peso vivo (g)	2036.73	2810.83	2034.83	2848.54	14.15	0.161
Peso CF (g)	1305.81	1836.01	1325.46	1860.35	11.22	0.834
CF (%PV)	64.13	65.33	65.15	65.31	0.40	0.193
Peso RTE (g)	1326.45	1864.68	1346.66	1887.80	14.15	0.904
RTE (%PV)	65.14	66.35	66.19	66.27	0.43	0.183
Polmoni (%CF)	24.30	22.23	24.19	22.20	0.29	0.894
Coscia (%CF)	33.16	34.86	33.04	34.76	0.29	0.953
Milza (%PV)	0.14	0.13	0.16	0.15	0.01	1.000
Borsa di Fabrizio (%PV)	0.20 <sup>b</sup>	0.22 <sup>ab</sup>	0.25 <sup>a</sup>	0.19 <sup>b</sup>	0.02	0.020
Fegato (%PV)	1.89	1.80	1.91	1.82	0.05	0.975
Cuore (%PV)	0.46	0.50	0.48	0.53	0.01	0.771
Proventriglio (%PV)	0.36	0.36	0.35	0.35	0.01	0.694
Ventriglio (%PV)	3.48	3.51	3.66	3.36	0.14	0.253
Grasso Addominale (%PV)	1.96	1.23	2.07	0.79	0.25	0.270

*Abbreviazioni: CC: carcassa a caldo CF, carcassa fredda; PV, peso vivo; RTE, ready to eat; SEM, errore standard della media; CF=femmine del controllo; CM=maschi del controllo; LF=femmine del gruppo larve; LM=maschi del gruppo larve.*

### 9.3 ANALISI ISTOMORFOMETRICHE

Gli effetti della dieta, del sesso, dei vari tratti dell'intestino (duodeno, digiuno, ileo) e della loro interazione sugli indici morfometrici sono visibili nel dettaglio nelle **Tabelle 7 e 8**.

La dieta non ha influenzato significativamente gli indici morfometrici ( $P > 0.005$ ). Il sesso ha invece influenzato  $V_h$ , l'area di assorbimento e lo spessore della mucosa ( $P < 0.05$ ). Nello specifico, i maschi hanno mostrato una maggiore altezza dei villi, una maggiore area di assorbimento della mucosa e un maggiore spessore della mucosa rispetto alle femmine ( $P < 0.05$ ).

Differenze significative sono anche state registrate tra i diversi segmenti intestinali. Infatti, il duodeno ha mostrato altezza e larghezza dei villi, area di assorbimento, spessore della mucosa e rapporto tra altezza villi e profondità delle cripte maggiori rispetto a digiuno e ileo ( $P < 0.001$ ). Al contrario, lo spessore della muscolare è aumentato dal duodeno al digiuno /ileo ( $P < 0.001$ ) (**Figura 7**).

Per quanto riguarda l'interazione tra dieta e sesso, LF ha mostrato una minor larghezza dei villi rispetto agli altri gruppi ( $P = 0.016$ ).

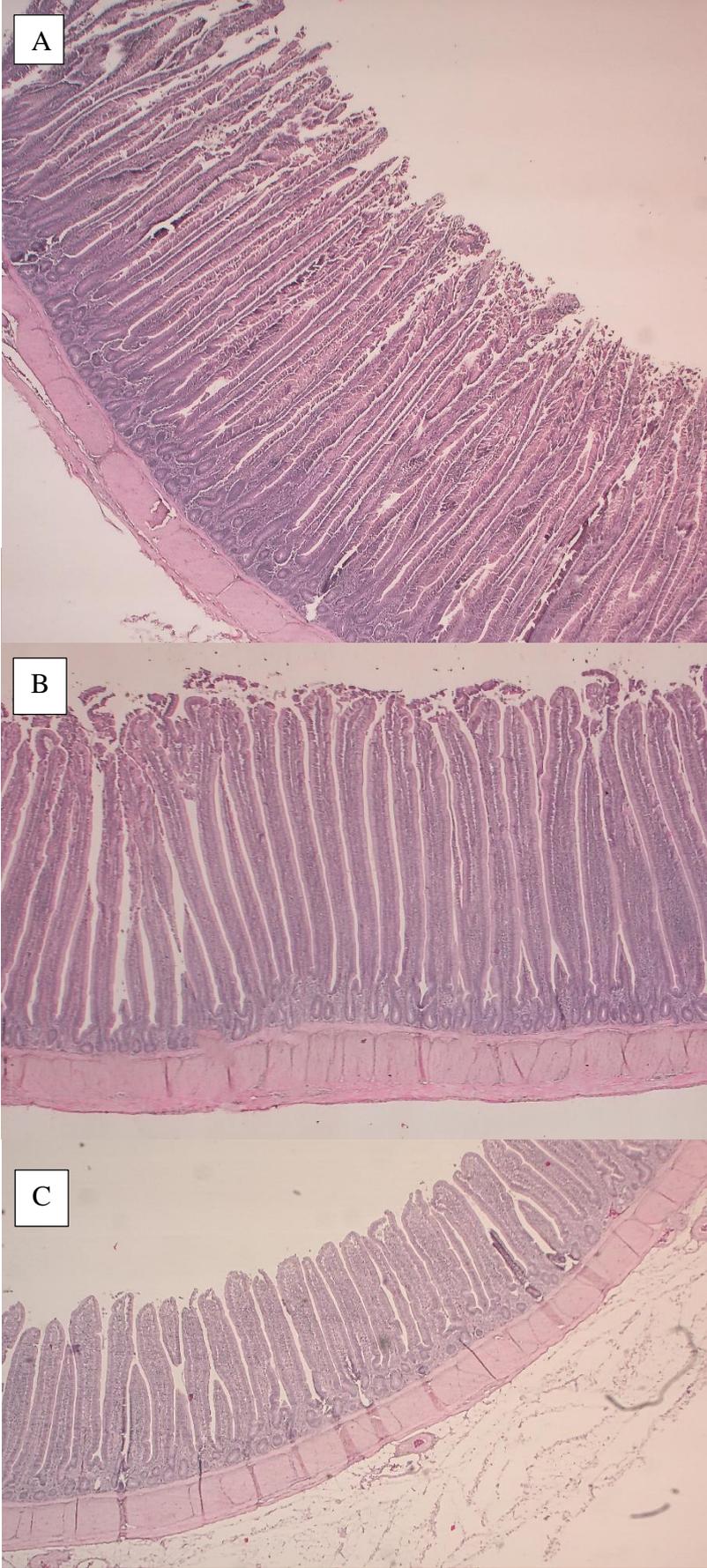
Non si sono rilevate differenze significative su nessuno degli indici morfometrici valutati per quanto riguarda l'interazione tra dieta e segmento intestinale, tra sesso e segmento intestinale o tra sesso, dieta e segmento intestinale.

Gli effetti della dieta, del sesso e della loro interazione sulla presenza di eventuali lesioni istopatologiche sui tratti dell'intestino tenue e su fegato, milza e borsa di Fabrizio, sono visibili nel dettaglio nelle **Tabelle 8 e 9**.

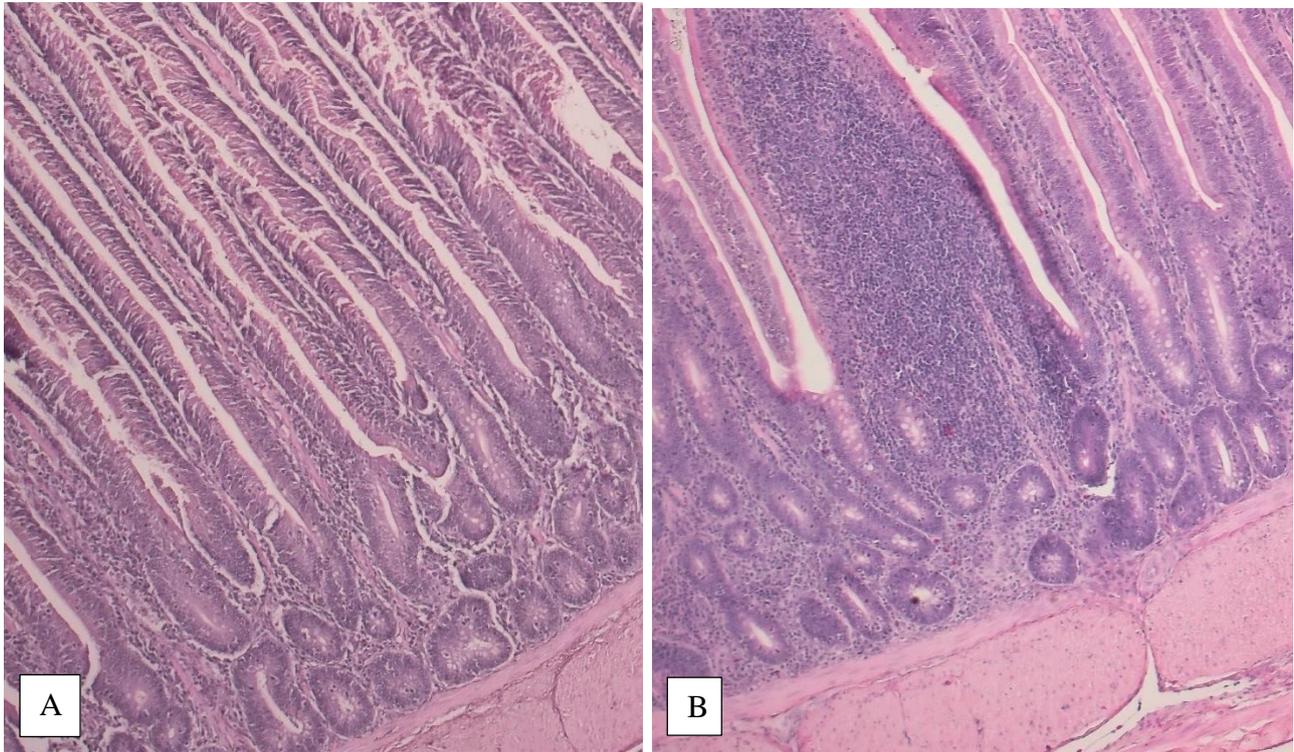
Non sono state evidenziate differenze significative nell'entità delle lesioni istopatologiche dei vari organi oggetti di studio tra i gruppi, ad eccezione della degenerazione del fegato che è risultata maggiore nelle femmine rispetto ai maschi ( $P = 0.022$ ).

Tuttavia indipendentemente dalla dieta e dal sesso si sono comunque osservate le seguenti lesioni: da assente a moderata enterite linfoplasmocellulare con o senza attivazione di GALT nell'intestino (**Figure 8, 9, 10**); da assente a moderata degenerazione vacuolare e infiammazione linfoplasmocellulare nel fegato (**Figura 11**) e da assente a lieve deplezione follicolare nella borsa di Fabrizio (**Figura 12**). La milza non presentava lesioni significative (**Figura 13**).

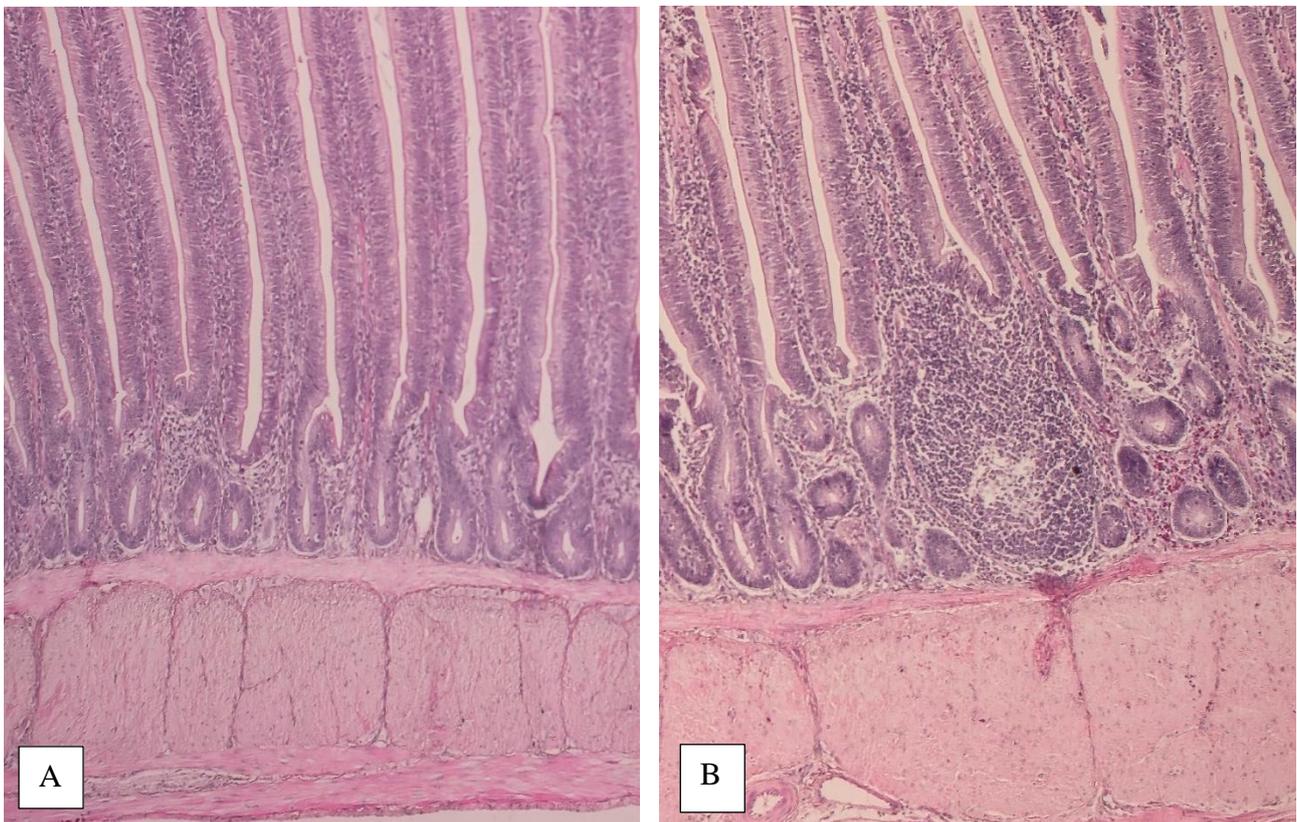
**Figura 7.** Sezioni istologiche di duodeno (A), digiuno (B) e ileo (C) in cui si può vedere il gradiente prossimo-distale degli indici morfometrici. (Ematossilina-eosina, 2.5x)



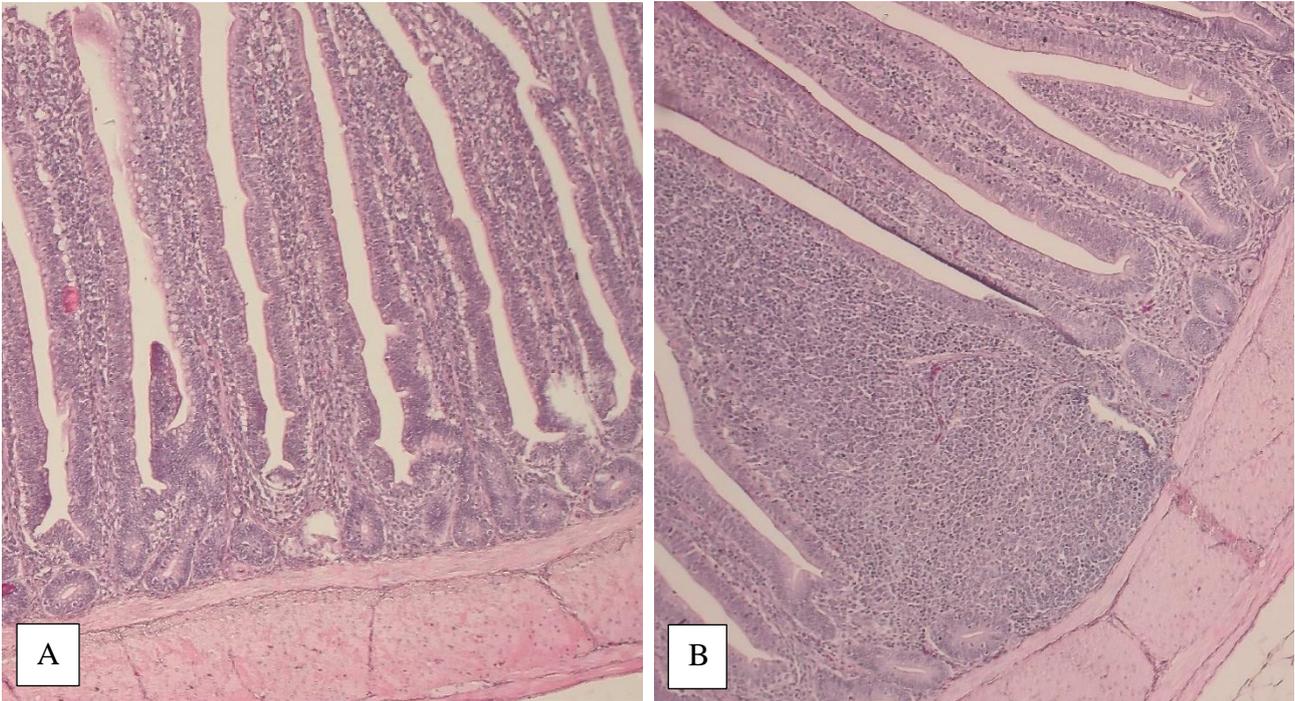
**Figura 8** *Principali reperti istopatologici del duodeno dei polli del presente trial. A) Intestino normale (grado 0), Ematossilina-eosina, 10x; B) Lieve e multifocale enterite linfoplasmocellulare (grado 1), Ematossilina-eosina, 10x.*



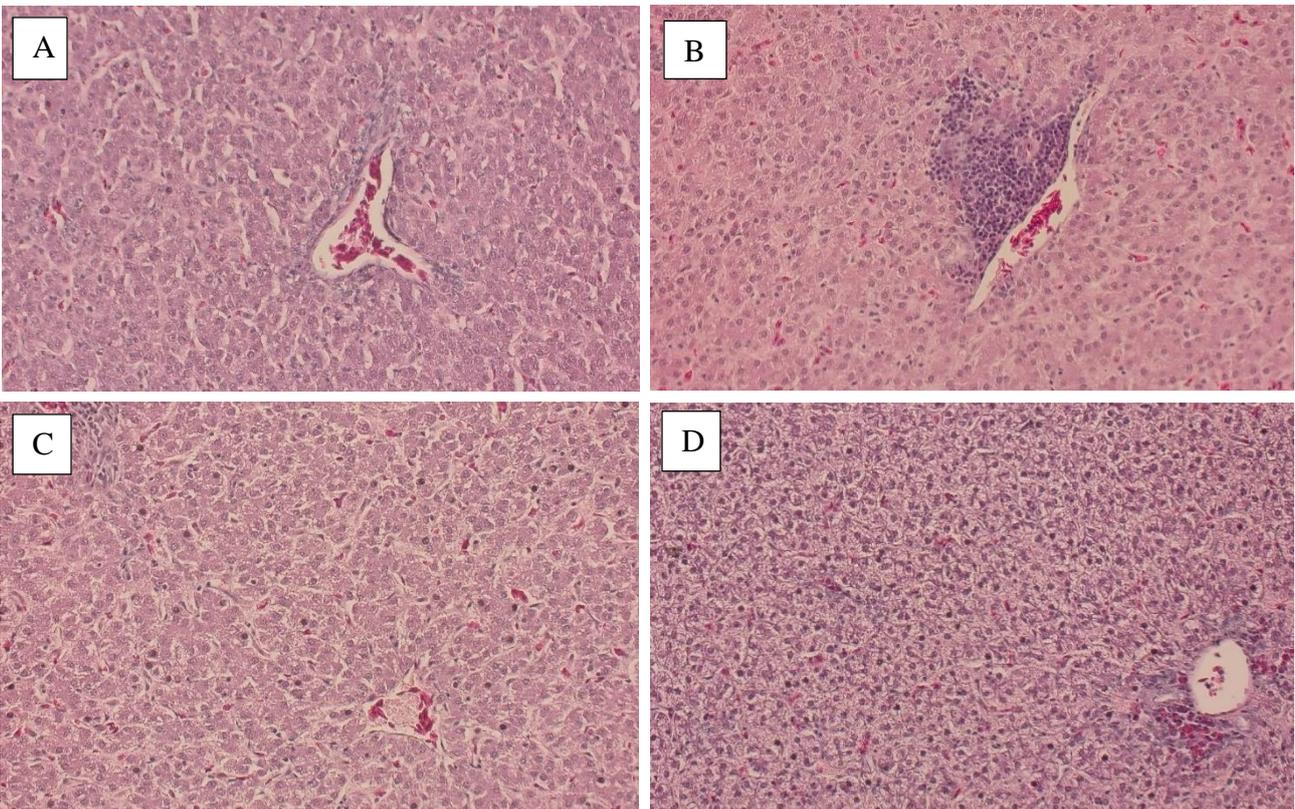
**Figura 9.** *Principali reperti istopatologici del digiuno dei polli del presente trial. A) Intestino normale (grado 0), Ematossilina-eosina, 10x; B) Lieve e multifocale enterite linfoplasmocellulare (grado 1), Ematossilina-eosina, 10x.*



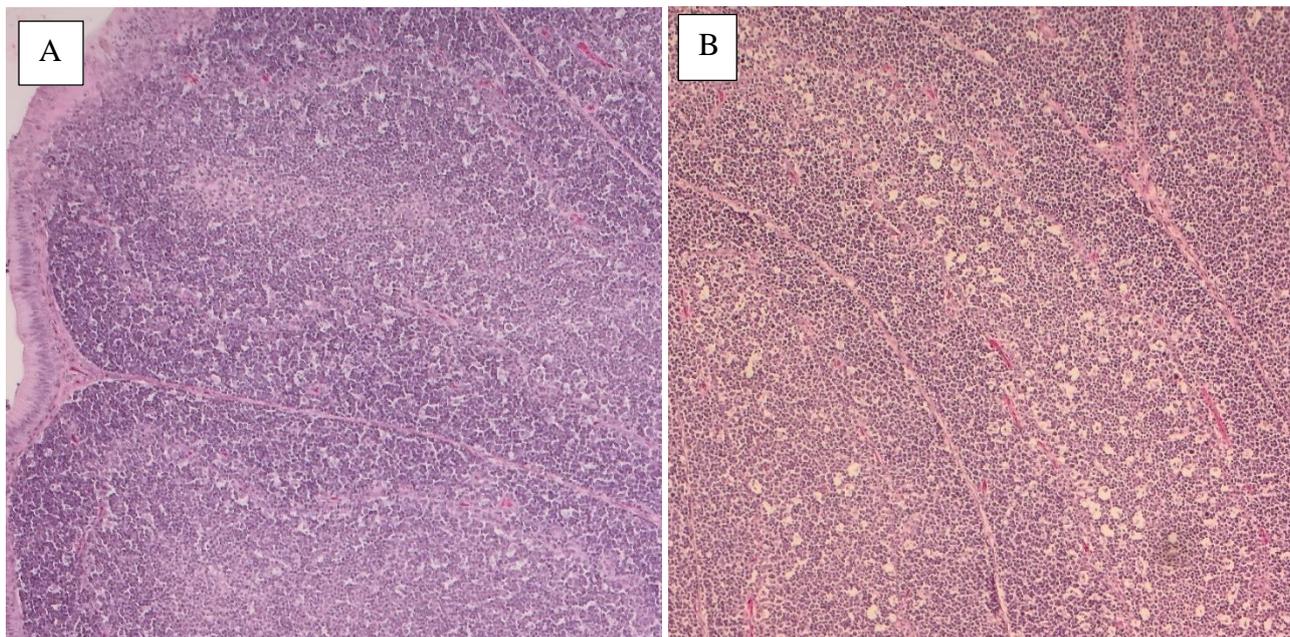
**Figura 10.** *Principali reperti istopatologici dell'ileo dei polli del presente trial. A) Intestino normale (grado 0), Ematossilina-eosina, 10x; B) Lieve e multifocale enterite linfoplasmocellulare (grado 1), Ematossilina-eosina, 10x.*



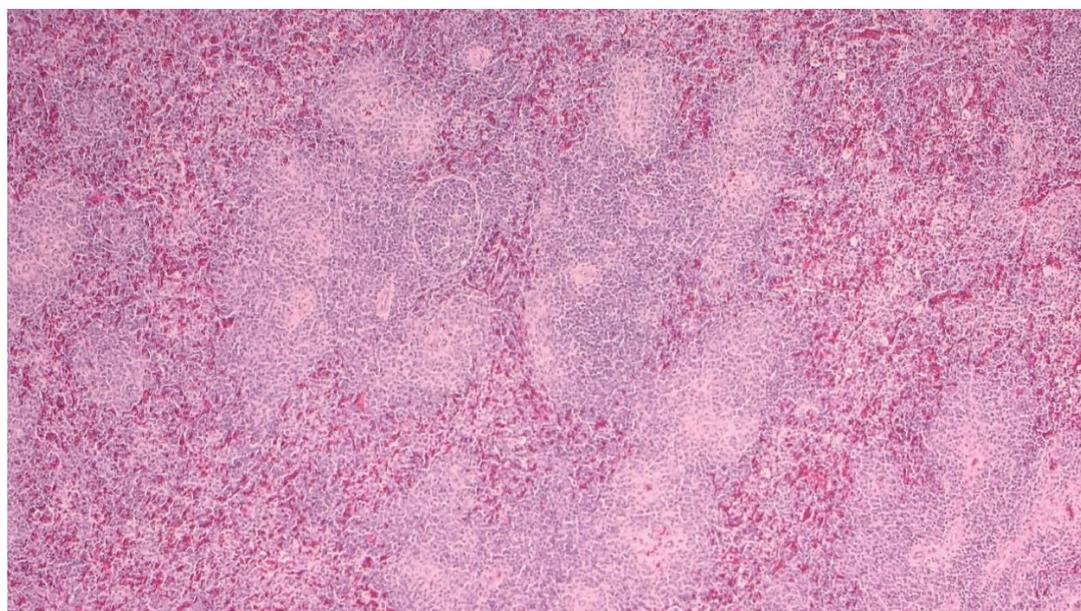
**Figura 11.** *Principali reperti istopatologici del fegato dei polli del presente trial; A) Fegato normale (grado 0), Ematossilina-eosina, 20x; B) Lieve infiammazione linfoplasmocellulare (grado 1), Ematossilina-eosina, 20x; C) Lieve degenerazione vacuolare (grado 1), Ematossilina-eosina, 20x; D) moderata degenerazione vacuolare (grado 2), Ematossilina-eosina, 20x.*



**Figura 12.** *Principali reperti istopatologici della borsa di Fabrizio dei polli del presente trial; A) borsa normale (grado 0), E-e, 10x; B) lieve deplezione follicolare (grado 1), E-e.*



**Figura 13.** *Principali reperti istopatologici della milza dei polli del presente trial; milza normale (grado 0), Ematossilina-eosina, 10x.*



**Tabella 7.** Indici morfometrici intestinali osservati nei polli del presente studio (n=12 polli/trattamento)

	Dieta (D)		SEM	Sesso (S)		SEM	Segmento Intestinale			SEM	P-value						
	C	L		F	M		DU	JE	I		D	S	I	DXS	DXI	IXS	DXSXI
	Vh	0.58	0.59	0.01	0.57	0.60	0.01	0.86 <sup>a</sup>	0.45 <sup>b</sup>	0.43 <sup>b</sup>	0.01	0.330	0.047	<0.001	0.749	0.543	0.919
Vw	0.07	0.06	0.01	0.05	0.07	0.01	0.06 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.01	0.340	0.084	<0.001	0.016	0.518	0.698	0.646
Cd	0.05	0.05	0.01	0.04	0.05	0.01	0.05	0.05	0.05	0.01	0.140	0.059	0.260	0.161	0.250	0.690	0.876
Vh/Cd	12.23	12.91	0.36	12.46	12.68	0.36	18.48 <sup>a</sup>	10.14 <sup>b</sup>	9.08 <sup>b</sup>	0.44	0.240	0.766	<0.001	0.669	0.571	0.727	0.748
Area	0.12	0.11	0.01	0.10	0.13	0.01	0.17 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	0.09 <sup>b</sup>	0.01	0.420	0.001	<0.001	0.100	0.477	0.421	0.989
Muc	0.70	0.670	0.01	0.67	0.72	0.01	1.02 <sup>a</sup>	0.54 <sup>b</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.02	0.670	0.040	<0.001	0.928	0.773	0.994	0.869
Musc	0.11	0.13	0.01	0.13	0.12	0.01	0.12 <sup>a</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.14 <sup>b</sup>	0.01	0.140	0.722	<0.001	0.889	0.588	0.524	0.545

Le lettere a e b riportate in apice identificano differenze statisticamente significative tra i vari gruppi per gli organi considerati ( $P < 0.05$ ).

Abbreviazioni: Vh, altezza villi; Vw, larghezza villi; Cd, profondità cripte; Area, area di assorbimento della mucosa; Muc, spessore strato mucosa; Musc, spessore strato muscolare; F= gruppo femmine; M=gruppo maschi; C=gruppo controllo; L=gruppo larve; DU, duodeno; JE, digiuno; I, ileo; SEM, errore standard della media.

**Tabella 8.** Effetti dell'interazione tra dieta e sesso sugli indici morfometrici intestinali osservati nei polli del presente studio (n=12 polli/trattamento).

	Dieta*sesso				SEM	P-value D*S
	CF	CM	LF	LM		
Vh	0.57	0.58	0.56	0.62	0.03	0.749
Vw	0.06 <sup>ab</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.05 <sup>b</sup>	0.06 <sup>ab</sup>	0.01	0.016
Cd	0.05	0.05	0.04	0.05	0.01	0.161
Vh/Cd	11.98	12.48 (5.14)	12.93 (5.65)	12.88 (4.72)	0.50	0.669
Area	0.10	0.13 (0.10)	0.10 (0.05)	0.12 (0.05)	0.01	0.100
Spessore mucosa	0.68	0.72	0.67	0.72	0.02	0.928
Spessore muscolare	0.11	0.11	0.14	0.13	0.02	0.889

Le lettere a e b riportate in apice identificano differenze statisticamente significative tra i vari gruppi per gli organi considerati ( $P < 0.05$ ).

Abbreviazioni: Vh, altezza villi; Vw, larghezza villi; Cd, profondità cripte; Area, area di assorbimento della mucosa; CF= femmine del controllo; CM=maschi del controllo; LF=femmine del gruppo larve; LM=maschi del gruppo larve; SEM, errore standard della media.

**Tabella 9.** Principali lesioni istologiche riscontrate negli organi dei polli del presente studio (n=12 polli/trattamento)

	Dieta (D)		Sesso (S)		P-value	
	C	L	F	M	D	S
Duodeno, <i>mediana (IR)</i>	0.50 (0.50-1.00)	0.50 (0.00-1.00)	0.50 (0.00-1.00)	0.50 (0.00-1.00)	0.389	0.389
Digiuno, <i>mediana (IR)</i>	1.00 (0.50-1.50)	1.00 (0.00-2.00)	1.00 (0.50-1.50)	1.25 (0.00-2.00)	0.811	0.104
Ileo, <i>mediana (IR)</i>	1.50 (1.00-2.50)	1.50 (0.50-2.00)	1.50 (0.50-2.00)	1.62 (1.00-2.50)	0.662	0.662
Fegato						
Inflammatione, <i>mediana (IR)</i>	1.00 (0.50-1.50)	1.00 (0.00-1.50)	0.50 (0.00-1.50)	1.00 (0.50-1.50)	0.569	0.094
Degenerazione, <i>mediana (IR)</i>	0.00 (0.00-2.00)	0.00 (0.00-2.00)	0.75 (0.00-2.00)	0.00 (0.00-1.00)	0.410	0.022
Milza, <i>mediana (IR)</i>	Assenza di lesioni					
Borsa di Fabrizio, <i>mediana (IR)</i>	0.50 (0.00-1.00)	0.75 (0.00-1.00)	0.50 (0.00-1.00)	0.50 (0.00-1.00)	0.252	0.869

Abbreviazioni: F= gruppo femmine; M=gruppo maschi; C=gruppo controllo; L=gruppo larve; DU, duodeno; JE, digiuno; I, ileo; SEM, errore standard della media; IR, range interquartile.

**Tabella 10.** Effetti dell'interazione tra dieta e sesso sulle principali lesioni istologiche negli organi dei polli del presente studio (n=12 polli/trattamento)

	Dieta*Sesso				P-value
	CF	CM	LF	LM	
Duodeno, <i>mediana (IR)</i>	0.50 (0.50-1.00)	0.50 (0.50-1.00)	0.50 (0.00-1.00)	0.50 (0.50-1.00)	0.389
Digiuno, <i>mediana (IR)</i>	1.00 (0.50-1.00)	1.50 (1.00-1.50)	1.00 (0.50-1.00)	1.50 (1.00-1.50)	0.400
Ileo, <i>mediana (IR)</i>	1.50 (1.00-2.00)	1.50 (1.00-2.00)	1.50 (0.50-1.62)	1.50 (1.00-1.62)	>0.999
Fegato					
Infiammazione, <i>mediana (IR)</i>	1.00 (0.50-1.00)	1.00 (0.50-1.00)	0.50 (0.00-1.00)	1.00 (0.50-1.00)	0.258
Degenerazione, <i>mediana (IR)</i>	0.25 (0.00-1.00)	0.00 (0.00-1.12)	1.00 (0.00-1.25)	0.00 (0.00-1.12)	0.410
Milza, <i>mediana (IR)</i>	Assenza di lesioni				
Borsa di Fabrizio, <i>mediana (IR)</i>	0.25 (0.00-1.00)	0.50 (0.00-1.00)	0.75 (0.00-1.00)	0.75 (0.00-1.00)	0.620

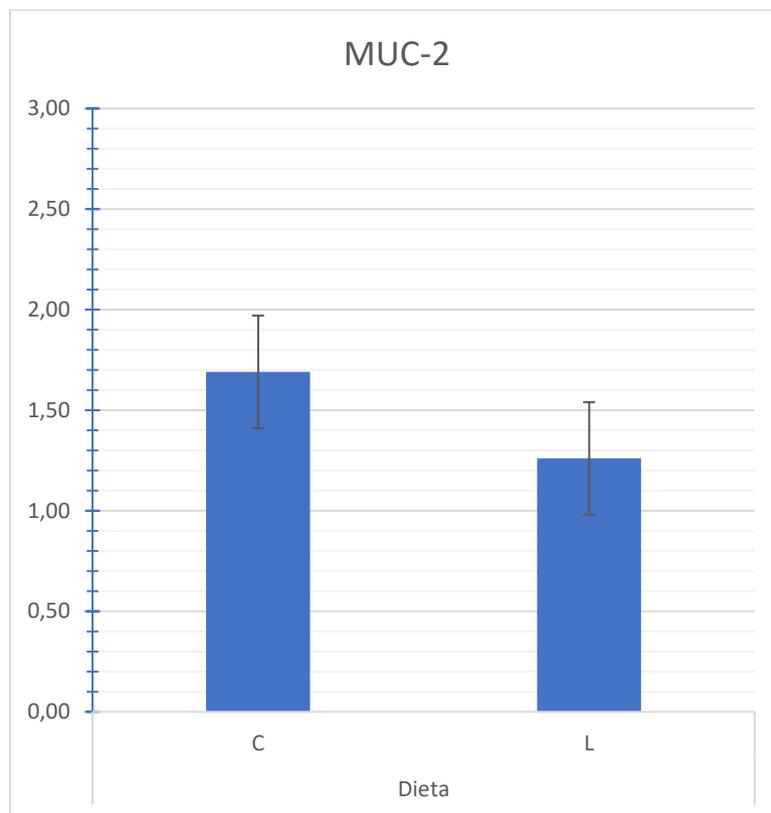
Abbreviazioni: CF= femmine del controllo; CM=maschi del controllo; LF=femmine del gruppo larve; LM=maschi del gruppo larve; SEM, errore standard della media; IR, range interquartile

#### 9.4 ESPRESSIONE GENICA DELLA MUCINA

Gli effetti della dieta, del sesso e della loro interazione sull'espressione di MUC-2 nel digiuno sono visibili nel dettaglio nei **Grafici 1, 2 e 3**.

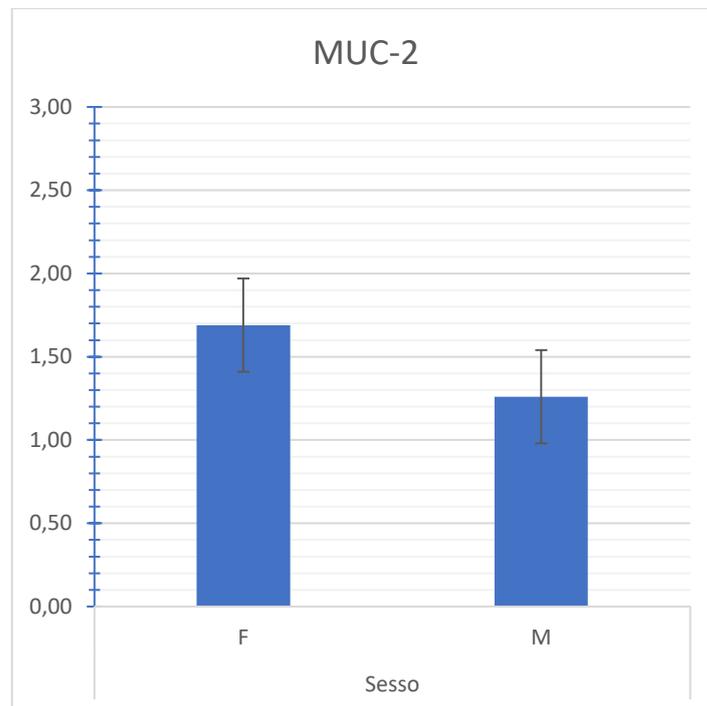
Non stati evidenziati effetti significativi da parte di dieta, sesso o una loro interazione nell'espressione di MUC-2 nel digiuno. ( $P > 0.05$ ).

**Grafico 1.** Effetto della dieta sull'espressione di MUC2 nel digiuno dei polli del seguente studio (n=12 polli/trattamento).



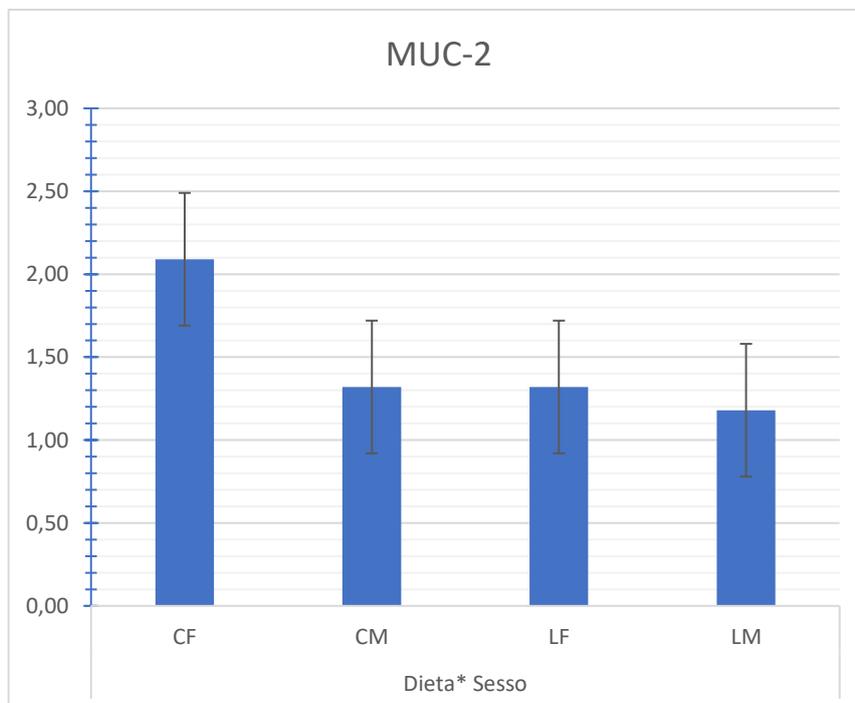
*Abbreviazioni: C=gruppo controllo; L=gruppo larve.*

**Grafico 2.** Effetto del sesso sull'espressione di MUC-2 nel digiuno dei polli del seguente studio (n=12 polli/trattamento).



Abbreviazioni: F= gruppo femmine; M=gruppo maschi.

**Grafico 3.** Effetti dell'interazione (tra il trattamento e il sesso) sull'espressione di MUC2 nel digiuno dei polli del seguente studio (n=12 polli/trattamento).



Abbreviazioni: CF= femmine del controllo; CM=maschi del controllo; LF=femmine del gruppo larve; LM=maschi del gruppo larve;

## 10. DISCUSSIONE

### 10.1 PERFORMANCES DI CRESCITA

La somministrazione di larve vive non ha modificato significativamente il peso, l'incremento giornaliero medio o l'ingestione di mangime giornaliera media. I risultati non sono in accordo con i precedenti studi di Ipema et al. (2020), dove la somministrazione di larve vive al 10% dell'AGM aveva mostrato PM, IGM, AGM migliori nel controllo che nel gruppo trattato. Al contrario, i risultati del presente studio sono in accordo con lo studio di Bellezza Oddon et al. (2021) dove però la quantità di larve vive somministrata era solo del 5% dell'AGM. I risultati, diversi dai precedenti studi, potrebbero essere stati condizionati dalla razza dei polli dato che il pollo a collo nudo presenta delle caratteristiche fisiologiche che lo rendono molto più resistente alle condizioni ambientali avverse e la sua natura, potrebbe aver influenzato la capacità digestiva delle larve, così come la salute intestinale in seguito al trattamento. Anche la composizione delle larve potrebbe aver svolto un ruolo nella differente risposta al trattamento dei polli della seguente prova. Secondo Makkar et al. (2014), infatti, la composizione chimica delle larve può variare in base al substrato su cui le larve crescono; basti pensare alla percentuale di acido grasso laurico, a spiccata azione antimicrobica, in grado di variare dal 21 al 43% passando da un substrato di letame di bovino, ad uno al 50% di letame bovino e 50% di frattaglie di pesce (Makkar et al., 2014).

La dieta non ha nemmeno modificato l'indice di conversione alimentare del 2° periodo (35-81 giorni di età) o dell'intero periodo (21-81 giorni di età), ma ha migliorato l'ICA del 1° periodo (21-35 giorni di età). Questo risultato trova solo parziale riscontro negli studi di Bellezza Oddon et al. (2021) e Dabbou et al. (2018) dove l'ICA non si è mai mostrato influenzato dalla somministrazione delle larve. L'ICA migliorato del 1° periodo potrebbero essere spiegato dalla migliore composizione nutrizionale della dieta addizionata con larve, soprattutto grazie all'elevato contenuto proteico di buon valore biologico, fondamentale nelle prime settimane di vita (Addeo et al. 2021). Nel complesso i risultati riscontrati sembrano indicare la possibilità di utilizzo di un 10 % di larve vive di *Hermetia illucens* all'interno della dieta, data l'assenza di effetti negativi sulle performances di crescita.

Indipendentemente dalla dieta, i maschi hanno mostrato migliori performances di crescita rispetto alle femmine nel primo, nel secondo e nell'intero periodo. In particolare, l'ICA risultava simile tra maschi e femmine nel primo periodo e migliore nei maschi nel secondo periodo e nell'intera prova. Questi risultati sono in accordo con lo studio di Almeida e Zuber (2009), in cui si sono confrontate le performance di crescita di maschi e femmine di polli a collo nudo e broiler, alimentati con una dieta a base di cereali. È inoltre interessante notare che il manuale Aviagen per il Ross-308 registra differenze di sesso per il broiler analoghe a quelle registrate in questo studio. Infatti le differenze di performances tra i due sessi sono ben conosciute e sono considerate fisiologiche; il maschio è geneticamente predisposto a nutrirsi di più, a convertire meglio gli alimenti in energia e a crescere più in fretta.

Infine, è interessante sottolineare che l'interazione dieta e sesso ha influenzato l'ICA ( $P < 0.05$ ). Nel primo periodo il miglioramento dell'ICA si riscontrava nei maschi trattati rispetto al controllo mentre tra le femmine non vi erano differenze. Nel secondo periodo, invece, si verificava il contrario non registrando alcuna differenza tra i maschi ma solo tra le femmine, con un peggioramento degli ICA nel gruppo trattato rispetto al controllo. Questi risultati sono probabilmente dovuti ad un'ingestione eccessiva di chitina. Se infatti una piccola quantità di chitina indigerita può stimolare le fermentazioni di batteri produttori di

acidi grassi a corta catena, estremamente positivi per la salute intestinale, una quantità troppo alta agirebbe come materiale fermentescibile, favorendo la replicazione di batteri patogeni come *Helicobacter spp.* a spiccata azione mucolitica.

Nel calcolo della quantità di larve da somministrare è stato utilizzato come riferimento il tasso giornaliero di ingestione fornito dalle linee guida Aviagen, che indicavano valori simili tra maschi e femmine. Tuttavia, nella seguente prova le femmine hanno dimostrato un AGM inferiore. È quindi probabile che abbiano consumato una quantità di larve superiore al 10% AGM e questo potrebbe aver causato gli effetti negativi citati poc' anzi e quindi i peggiori indici di conversione.

## 10.2 CARATTERISTICHE DELLA CARCASSA

La somministrazione di larve vive non ha modificato significativamente il peso della carcassa o degli organi considerati nello studio ad eccezione del peso percentuale della milza sul peso vivo, risultato maggiore nei trattati che nei controlli. Questi risultati sono in accordo con lo studio di Bellezza Oddon et al. (2021), dove la somministrazione al 5% di larve vive sull'AGM non mostrava differenze significative per questi parametri. Tuttavia si è notato che il peso della carcassa seguiva un trend statistico in accordo con la somministrazione di larve sgrassate al 10% dello studio di Schiavone et al. (2018). Infatti anche se non è statisticamente significativo il peso della carcassa era numericamente superiore nei trattati rispetto ai controlli.

Per quanto riguarda il peso della milza (%PV), il risultato è in accordo con Bellezza Oddon et al. (2021). L'aumentato peso registrato nel gruppo trattato rispetto al controllo potrebbe essere spiegato dall'effetto immunostimolante della chitina sulla polpa bianca della milza come dimostrato da Bovera et al. (2016). Inoltre sempre secondo Bovera et al (2016) l'azione del corticosterone, prodotto in seguito a condizioni di stress cronico, inibisce la crescita degli organi linfoidei portando ad un minor peso dell'organo. Di conseguenza, i polli alimentati con le larve potrebbero essersi ritrovati in una condizione di maggior benessere rispetto a quelli del gruppo controllo.

Indipendentemente dalla dieta, esattamente come per le performances di crescita, i polli maschi hanno mostrato un maggior peso vivo, peso CF (g), peso CPC (g), peso della coscia (%PV) e peso del cuore (%PV), rispetto alle femmine. Grasso addominale (%PV) e polmone (%PV) erano invece maggiori nelle femmine. Questi risultati sono in accordo con López et al. (2011), Cygan-Szczegielniak e Bogucka (2021) e Cave et al. (1985), che dimostrano come le differenze nel peso percentuale degli organi sul peso vivo siano dovute al maggiore sviluppo di masse muscolari nei maschi rispetto alle femmine, fenomeno del tutto fisiologico. Per quanto riguarda l'interazione tra sesso e dieta questa ha influenzato il peso percentuale della borsa di Fabrizio (P=0.020). Nello specifico il gruppo LF ha mostrato un maggiore peso della borsa di Fabrizio rispetto ai gruppi CF. Probabilmente la diversa quantità di larve assunte dalle femmine, superiore al 10% AGM, rispetto ai maschi, potrebbe aver causato, come per la milza, una maggiore stimolazione dell'organo linfoide, portando all'aumentato peso. Infatti, la chitina ha un effetto immunostimolante sul tessuto linfoide e questi risultati ne sono un'ulteriore conferma.

### 10.3 ANALISI ISTOMORFOMETRICHE

La dieta non ha influenzato significativamente gli indici morfometrici ( $P > 0.05$ ). Questo è in accordo con lo studio di Bellezza Oddon et al. (2021) che ha somministrato però il 5% AGM di larve vive, e con Dabbou et al. (2018), che ha somministrato il 10% AGM di larve sgrassate. La struttura microscopica dell'intestino, misurabile attraverso l'utilizzo di indici morfometrici quali l'altezza e la larghezza dei villi, la profondità delle cripte, l'area di assorbimento e lo spessore stesso della mucosa, è considerata uno dei principali indicatori dello stato di salute, di sviluppo e funzionalità intestinale. Un intestino sano è in grado di migliorare considerevolmente la capacità del pollo di assorbire e usare efficacemente i nutrienti contenuti nella dieta. Infatti, un'aumentata lunghezza e larghezza dei villi è associata con una maggiore capacità di digestione e assorbimento, tramite una maggiore secrezione di enzimi digestivi e trasportatori dei nutrienti attraverso la parete intestinale con meccanismi paracellulari o intracellulari. Una diminuita profondità delle cripte è invece associata con una ridotta rigenerazione cellulare dei villi, indicativa di un ambiente intestinale con una minore quantità di agenti patogeni di natura fisica, chimica, o biologica e quindi una minore necessità di ripristino dell'epitelio. Le energie, normalmente dirottate per la rigenerazione dei villi, in un intestino sano possono essere così indirizzate ad altre funzioni vitali come la crescita degli animali. Una migliorata salute intestinale è in grado, quindi di influenzare le performances di crescita e garantire un maggiore benessere all'animale (Ducatelle et al., 2018).

Il risultato della seguente prova dimostra, quindi, la mancanza di effetti deleteri dell'integrazione al 10% di larve vive di mosca soldato nera sulla morfometria intestinale e ne conferma la possibilità di utilizzo.

Indipendentemente dalla dieta, i maschi hanno mostrato  $V_h$ , spessore della mucosa e area di assorbimento maggiori rispetto alle femmine. Questi risultati trovano solo parziale riscontro nello studio di Chen et al. (2021), in cui i maschi di anatra a 10 settimane hanno mostrato una lunghezza dei villi intestinali superiore alle femmine. Al contrario, essi sono in disaccordo con lo studio di Humer et al. (2015) in cui broiler alimentati con un additivo fitogenico e macellati a 35 giorni non mostravano differenze nei parametri morfometrici. Per quanto riguarda le interazioni, l'interazione tra dieta e sesso ha influenzato la sola larghezza dei villi ( $P < 0.05$ ). Il gruppo LF, infatti, ha mostrato una minor larghezza dei villi rispetto agli altri gruppi. Analogamente, nello studio di Humer et al. (2015) i broiler alimentati con un additivo fitogenico, hanno mostrato un'interazione significativa tra sesso e dieta.

La discrepanza nei risultati potrebbe essere dovuta all'età dei soggetti dato che anche nello studio di Chen et al. (2021), le anatre non presentavano differenze significative legate al sesso sui parametri morfometrici nei soggetti più giovani. Secondo Humer et al. (2015), maschi e femmine posseggono naturalmente un microbiota differente che potrebbe influenzare la morfologia intestinale portando, con il progredire dell'età, a delle differenze significative. Inoltre secondo Humer et al. (2015), la capacità digestiva della popolazione batterica, differente tra i sessi, potrebbe avere anche influenzato l'effetto della dieta sulla morfologia intestinale.

La morfologia della parete intestinale si è vista anche influenzata dal tratto intestinale per tutti i marker considerati ad eccezione della profondità delle cripte. Questo è in accordo con gli studi di Bellezza Oddon et al. (2021), Biasato et al. (2018a), Dabbou et al. (2018) e Humer et al. (2011), in cui  $V_h$ ,  $V_h/Cd$ ,  $V_w$ , lo spessore della mucosa e l'area di assorbimento diminuivano dal duodeno all'ileo. In accordo con Humer et al. (2011) lo spessore della tonaca

muscolare si è registrato aumentare progredendo in senso distale nell'intestino. Per quanto riguarda le cripte, in accordo con Biasato et al. (2018a), ma in contrasto con Dabbou et al. (2018) e Bellezza Oddon et al. (2021) questa non si è vista influenzata dal segmento intestinale. Questi risultati sono dovuti alla diversa intensità di digestione e assorbimento dei nutrienti nei diversi tratti intestinali. Il duodeno, infatti, è il primo segmento dell'intestino tenue a ricevere gli stimoli fisici, chimici e ormonali provocati dalla dieta nel lume ed è quello che assorbe in maggiore quantità carboidrati, proteine e lipidi. Il duodeno, inoltre, è il tratto con la rigenerazione cellulare più veloce e, quindi, il primo a manifestare eventuali effetti legati alla variazione della dieta (Sjaastad e Hove, 2013). Questi risultati, quindi, coinciderebbero con un quadro fisiologico tipico di polli in buona salute.

Il trattamento non ha causato differenze significative tra i gruppi per quanto riguarda l'entità delle lesioni istopatologiche dei vari organi oggetto di studio. Questi risultati sono in accordo con gli studi di Dabbou et al. (2018), Bellezza Oddon et al. (2021) e Biasato et al. (2018a) e confermano la sicurezza nell'includere una dieta a base di insetti nell'alimentazione del pollo. Indipendentemente dalla dieta, le femmine hanno mostrato una maggiore degenerazione epatica rispetto ai maschi dovuto probabilmente al differente metabolismo lipidico tra i sessi. Gli estrogeni, infatti, stimolano la sintesi di acidi grassi attraverso la sovraregolazione dell'acetilCoA carbossilasi e della sintetasi degli acidi grassi. Questo meccanismo è particolarmente evidente durante il periodo di ovodeposizione nelle specie selezionate per la produzione di uova dato che su 60g d'uovo, 6 g sono rappresentati dai trigliceridi contenuti nel tuorlo (Tramunt et al. 2021). L'aumentata produzione e accumulo di trigliceridi, comunque presente anche al di fuori del periodo di ovodeposizione, potrebbe aver influito sul grado di degenerazione epatica ma dal momento che non esistono studi a conferma, ulteriori indagini sono necessarie per spiegare meglio questo risultato.

#### 10.4 MUC-2

Non stati evidenziati effetti significativi da parte di dieta, sesso o una loro interazione nell'espressione di MUC-2 nel digiuno. Questi risultati sono in accordo con lo studio di Colombino et al. (2021), in cui i polli alimentati con il 5% AGM di larve vive, non mostravano differenze rispetto ai controlli. Al contrario, Biasato et al. (2020), ha riscontrato un'aumentata espressione di MUC-2 rispetto al controllo a seguito della somministrazione di farina di larve sgrassate al 5% ed una sua riduzione con una somministrazione del 10%. Tuttavia, esattamente come per lo studio di Colombino et al. (2021) i risultati potrebbero trovare spiegazione nella differenza percentuale di materia secca tra le larve vive e quelle sgrassate. È importante sottolineare che il 10% di larve vive costituisce un quantitativo in materia secca inferiore al 10% di larve sgrassate e questo potrebbe aver impedito di osservare nel presente studio effetti positivi sull'espressione genica della MUC-2 ma anche di evitare gli effetti collaterali di una quantità troppo elevata di chitina nella dieta. Inoltre, a differenza di Biasato et al. (2020) e Colombino et al. (2021), in questo studio sono stati utilizzati polli a collo nudo anziché broiler. Nello studio di Biasato et al. (2018b) l'integrazione al 7.5% di larve di *Tenebrio molitor* in polli ruspanti non aveva mostrato differenze rispetto alla dieta a base di cereali. Le caratteristiche di razza potrebbero, quindi, aver influenzato la capacità digestiva della chitina e causato una differente risposta alla dieta in termini di espressione di MUC-2. La chitina è infatti in grado di stimolare indirettamente la quantità di mucine prodotte a livello intestinale attraverso la proliferazione batterica causata dalla sua indigeribilità e la

conseguente produzione di acidi grassi a corta catena da parte del microbiota (Kogut, 2017). Tuttavia una quantità di chitina troppo alta come visto nello studio di Biasato et al. (2020) ha un effetto deleterio sulla produzione di mucine dato che provoca una riduzione della popolazione di batteri produttori di acidi grassi a corta catena (*Bacteroides*) e inibitori di batteri patogeni come *Clostridium perfringens* nonché allo sviluppo di batteri ad azione mucolitica. La quantità di chitina e la capacità digestiva del soggetto potrebbero, quindi, essere dei fattori importanti nell'ottenimento di effetti positivi o negativi a seguito dell'integrazione di insetti o più in generale di chitina nella dieta.

Se il risultato della seguente prova conferma la possibilità di utilizzare il 10% di larve di *Hermetia illucens* nella dieta del pollo, ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio l'interazione tra questi fattori e definire la quantità ideale di chitina necessaria per ottenere un effetto benefico sulla salute intestinale.

## 11. CONCLUSIONI

L'obiettivo di questa tesi è stato valutare l'effetto di una dieta contenente larve vive di *Hermetia illucens* nel pollo a collo nudo. In particolare ci si è concentrati sull'effetto che la dieta ha avuto sulle performances di crescita, sulle caratteristiche della carcassa e sulla salute intestinale, valutando morfologia intestinale ed espressione delle mucine. Si sono inoltre valutati il grado di infiammazione e di degenerazione dei principali organi detossificanti e linfoidi per valutare la risposta sistemica dei polli alla dieta.

La dieta sperimentale, contenente il 10% sul tasso di ingestione giornaliero di larve vive, non ha influenzato le performances di crescita, le caratteristiche della carcassa, la morfologia della parete intestinale e l'espressione delle mucine. Al contrario, ha avuto effetti significativi sugli indici di conversione alimentare e sul peso degli organi linfoidi. In particolare ha causato l'aumento di peso di milza e borsa di Fabrizio, dimostrando che gli insetti possono avere un effetto immunostimolante benefico per la salute del pollo grazie al loro contenuto di chitina. Inoltre, la presenza delle larve nella dieta ha migliorato la conversione in energia del mangime fino ai 28 giorni di età, dimostrandosi un valido sostituto proteico dall'alto valore biologico, soprattutto nel primo mese di vita.

Infine la dieta sperimentale ha mantenuto le differenze di performances, caratteristiche della carcassa e morfologia intestinale tra i due sessi così come ha preservato il gradiente prossimo-distale degli indici morfometrici. Il mantenimento di queste ben note differenze fisiologiche, dimostra l'idoneità della dieta.

In conclusione, questi risultati confermano la possibilità di utilizzare le larve vive di *Hermetia illucens* al 10% del tasso di ingestione giornaliera nell'allevamento biologico di polli a collo nudo, rappresentando un potenziale strumento a favore dell'economia circolare, dell'ecosostenibilità e del benessere animale. Tuttavia ulteriori studi sono necessari per valutare l'influenza della razza avicola e del substrato utilizzato per la crescita delle larve sulle performances di crescita e sulla salute intestinale nonché per identificare la dose di chitina più adeguata per massimizzarne gli effetti benefici evitando, però, effetti deleteri sulla digeribilità dell'alimento. Ulteriori studi sugli effetti della somministrazione di larve vive di altre specie d'insetto come *Tenebrio molitor* o *Musca domestica*, potrebbero anche fornire dati interessanti circa il loro utilizzo nell'allevamento avicolo.

## 12. BIBLIOGRAFIA

Abd El-Hack M. E., Shafi M. E., Alghamdi W. Y., Abdelnour S. A., Shehata A. M., Noreldin A. E., Ashour E. A., et al., 2020. «Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Meal as a Promising Feed Ingredient for Poultry: A Comprehensive Review». *Agriculture* 10 (8): 339. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080339>.

Addeo N. F., Vozzo S., Secci G., Mastellone V., Piccolo G., Lombardi P., Parisi G. et al., 2021. «Different Combinations of Butchery and Vegetable Wastes on Growth Performance, Chemical-Nutritional Characteristics and Oxidative Status of Black Soldier Fly Growing Larvae». *Animals: an Open Access Journal from MDPI* 11 (12): 3515. <https://doi.org/10.3390/ani11123515>.

Alexandratos N., 2012. «World Agriculture towards 2030/2050: The 2012 Revision», 154.

Almeida A. M. e Zuber U., 2009. «The Effect of the Naked Neck Genotype (Nana), Feeding and Outdoor Rearing on Growth and Carcass Characteristics of Free Range Broilers in a Hot Climate». *Tropical Animal Health and Production* 42 (1): 99. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9391-y>.

Ariyadi B., Sudaryati S., Harimurti S., Wihandoyo, Sasongko H., Habibi M. F. e Rahayu D., 2019. «Effects of Feed Form on Small Intestine Histomorphology of Broilers». *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 387 (1): 012047. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/387/1/012047>.

Awad W. A., Hess C. e Hess M., 2017. «Enteric Pathogens and Their Toxin-Induced Disruption of the Intestinal Barrier through Alteration of Tight Junctions in Chickens». *Toxins* 9 (2): 60. <https://doi.org/10.3390/toxins9020060>.

Basu S. 2015. «The Transitional Dynamics of Caloric Ecosystems: Changes in The Food Supply Around the World». *Critical public health* 25 (3): 248–64. <https://doi.org/10.1080/09581596.2014.931568>.

Bellezza Oddon S., Biasato I., Imarisio A., Pipan M., Dekleva D., Colombino E., Capucchio M. T., et al., 2021. «Black Soldier Fly and Yellow Mealworm Live Larvae for Broiler Chickens: Effects on Bird Performance and Health Status». *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 105 (S1): 10–18. <https://doi.org/10.1111/jpn.13567>.

Biasato I., Gasco L., De Marco M., Renna M., Rotolo L., Dabbou S., Capucchio M. T., et al., 2018a. «Yellow Mealworm Larvae (*Tenebrio Molitor*) Inclusion in Diets for Male Broiler Chickens: Effects on Growth Performance, Gut Morphology, and Histological Findings». *Poultry Science* 97 (2): 540–48. <https://doi.org/10.3382/ps/pex308>.

Biasato I., Ferrocino I., Biasibetti E., Grego E., Dabbou S., Sereno A., Gai F., et al., 2018b. «Modulation of Intestinal Microbiota, Morphology and Mucin Composition by Dietary Insect Meal Inclusion in Free-Range Chickens». *BMC Veterinary Research* 14 (1): 383. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1690-y>.

Biasato I., Ferrocino I., Dabbou S., Evangelista R., Gai F., Gasco L., Cocolin L., et al., 2020. «Black Soldier Fly and Gut Health in Broiler Chickens: Insights into the Relationship between Cecal Microbiota and Intestinal Mucin Composition». *Journal of Animal Science and Biotechnology* 11: 11. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0413-y>.

Biasato I., Ferrocino I., Grego E., Dabbou S., Gai F., Gasco L., Cocolin L., et al., 2019. «Gut Microbiota and Mucin Composition in Female Broiler Chickens Fed Diets Including Yellow Mealworm (*Tenebrio Molitor*, L.)». *Animals: An Open Access Journal from MDPI* 9 (5): E213. <https://doi.org/10.3390/ani9050213>.

Bovera F., Loponte R., Marono S., Piccolo G., Parisi G., Iaconisi V., Gasco L., et al., 2016. «Use of *Tenebrio molitor* larvae meal as protein source in broiler diet: Effect on growth performance, nutrient digestibility, and carcass and meat traits». *Journal of Animal Science* 94 (2): 639–47. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9201>.

Cave N. A. G., Bentley A. H. e MacLean H., 1985. «The Effect of Intermittent Lighting on Growth, Feed:Gain Ratio, and Abdominal Fat Content of Broiler Chickens of Various Genotypes and Sex1». *Poultry Science* 64 (3): 447–53. <https://doi.org/10.3382/ps.0640447>.

Chen X., Hu B., Huang L., Cheng L., Liu H., Hu J., Hu S., et al. 2021. «The Differences in Intestinal Growth and Microorganisms between Male and Female Ducks». *Poultry Science* 100 (2): 1167–77. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.051>.

Chi Q., Hu X., Liu Z., Han Y., Tao D., Xu S. e Li S., 2021. «H2S Exposure Induces Cell Death in the Broiler Thymus via the ROS-Initiated JNK/MST1/FOXO1 Pathway». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 222 (ottobre): 112488. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112488>.

Čičková H., Newton G. L., Lacy R. C. e Kozánek M., 2015. «The Use of Fly Larvae for Organic Waste Treatment». *Waste Management* 35 (gennaio): 68–80. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2014.09.026>.

Colombino E., Biasato I., Ferrocino I., Bellezza Oddon S., Caimi C., Gariglio M., Dabbou S., et al., 2021. «Effect of Insect Live Larvae as Environmental Enrichment on Poultry Gut Health: Gut Mucin Composition, Microbiota and Local Immune Response Evaluation». *Animals* 11 (10): 2819. <https://doi.org/10.3390/ani11102819>.

Cullere M., Woods M. J., van Emmenes L., Pieterse E., Hoffman L. C., e Dalle Zotte A., 2019. «*Hermetia Illucens* Larvae Reared on Different Substrates in Broiler Quail Diets: Effect on Physicochemical and Sensory Quality of the Quail Meat». *Animals* 9 (8): 525. <https://doi.org/10.3390/ani9080525>.

Cygan-Szczegieliński D. e Bogucka J., 2021. «Growth Performance, Carcass Characteristics and Meat Quality of Organically Reared Broiler Chickens Depending on Sex». *Animals: an Open Access Journal from MDPI* 11 (11): 3274. <https://doi.org/10.3390/ani11113274>.

- Dabbou S., Gai F., Biasato I., Capucchio M. T., Biasibetti E., Dezzutto D., Meneguz M., et al., 2018. «Black soldier fly defatted meal as a dietary protein source for broiler chickens: Effects on growth performance, blood traits, gut morphology and histological features». *Journal of Animal Science and Biotechnology* 9 (1): 49. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0266-9>.
- Deplancke B. e Gaskins H. R., 2001. «Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer». *The American Journal of Clinical Nutrition* 73 (6): 1131S-1141S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.6.1131S>.
- Dharmani P., Srivastava V., Kisson-Singh V. e Chadee K., 2009. «Role of Intestinal Mucins in Innate Host Defense Mechanisms against Pathogens». *Journal of Innate Immunity* 1 (2): 123–35. <https://doi.org/10.1159/000163037>.
- Diaz Carrasco J.M., Casanova N. A. e Miyakawa M. E. F., 2019. «Microbiota, Gut Health and Chicken Productivity: What Is the Connection?» *Microorganisms* 7 (10): 374. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100374>.
- Diclaro II J.W. e Kaufman P. E., 2009. «Black Soldier Fly *Hermetia Illucens* Linnaeus (Insecta: Diptera: Stratiomyidae): EENY 461/IN830, 6/2009». *EDIS* 2009 (7). <https://doi.org/10.32473/edis-in830-2009>.
- Diener S., Zurbrügg C., Gutiérrez F. R., Nguyen D. H., Morel A., Koottatep T. e Tockner K., 2011. «Black Soldier Fly Larvae For Organic Waste Treatment – Prospects And Constraints», 8.
- Ducatelle R., Goossens E., De Meyer F., Eeckhaut V., Antonissen G., Haesebrouck F., e Van Immerseel F., 2018. «Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives». *Veterinary Research* 49: 43. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0538-6>.
- El Cafsi I., Bjeoui S., Rabeh I., Nechi S., Chelbi E., El Cafsi M. e Ghram A., 2020. «Effects of Ochratoxin A on Membrane Phospholipids of the Intestine of Broiler Chickens, Practical Consequences». *Animal* 14 (5): 933–41. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002593>.
- Elkholy S., Mogawer S. e Farag A., 2017. «Nodular Lymphoid Hyperplasia of the Gastrointestinal Tract : A Comprehensive Review», 6.
- Forder R. E. A., Howarth G. S., Tivey D. R. e Hughes R. J., 2007. «Bacterial Modulation of Small Intestinal Goblet Cells and Mucin Composition During Early Posthatch Development of Poultry1». *Poultry Science* 86 (11): 2396–2403. <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00222>.
- González N., Marquès M., Nadal M. e Domingo J. L., 2020. «Meat Consumption: Which Are the Current Global Risks? A Review of Recent (2010-2020) Evidences». *Food Research International* (Ottawa, Ont.) 137 (novembre): 109341. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109341>.

- Hu S., Wang Y., Wen X., Wang L., Jiang Z., e Zheng C., 2018. «Effects of low-molecular-weight chitosan on the growth performance, intestinal morphology, barrier function, cytokine expression and antioxidant system of weaned piglets». *BMC Veterinary Research* 14 (1): 215. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1543-8>.
- Humer E., Rohrer E., Windisch W., Wetscherek W., Schwarz C., Jungbauer L., e Schedle K., 2015. «Gender-Specific Effects of a Phytogenic Feed Additive on Performance, Intestinal Physiology and Morphology in Broiler Chickens». *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99 (4): 788–800. <https://doi.org/10.1111/jpn.12238>.
- Ipema A. F., Gerrits W. J. J., Bokkers E. A. M., Kemp B., e Bolhuis J. E., 2020. «Provisioning of Live Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia Illucens*) Benefits Broiler Activity and Leg Health in a Frequency- and Dose-Dependent Manner». *Applied Animal Behaviour Science* 230 (settembre): 105082. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105082>.
- Jones R. B., Carmichael N. e Williams C., 1998. «Social Housing and Domestic Chicks' Responses to Symbolic Video Images». *Applied Animal Behaviour Science* 56 (2): 231–43. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00099-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00099-3).
- Katare B., Wang H. H., Lawing J., Hao N., Park T., e Wetzstein M., 2020. «Toward Optimal Meat Consumption». *American Journal of Agricultural Economics* 102 (2): 662–80. <https://doi.org/10.1002/ajae.12016>.
- Kawasaki K., Hashimoto Y., Hori A., Kawasaki T., Hirayasu H., Iwase S., Hashizume A., et al., 2019. «Evaluation of Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Larvae and Pre-Pupae Raised on Household Organic Waste, as Potential Ingredients for Poultry Feed». *Animals* 9 (3): 98. <https://doi.org/10.3390/ani9030098>.
- Khan S., 2018. «Recent advances in role of insects as alternative protein source in poultry nutrition». *Journal of Applied Animal Research* 46 (1): 1144–57. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1474743>.
- Kogut M., 2017. «Gut health in poultry». *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* 12 (ottobre). <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201712031>.
- Lee C. G., Da Silva C. A., Lee J., Hartl D., e Elias J. A., 2008. «Chitin Regulation of Immune Responses: An Old Molecule with New Roles». *Current Opinion in Immunology, Autoimmunity / Allergy and Hypersensitivity*, 20 (6): 684–89. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.10.002>.
- Lee J., Kim Y., Park Y., Yang Y., Jung B., e Lee B., 2018. «Black Soldier Fly (*Hermetia Illucens*) Larvae Enhances Immune Activities and Increases Survivability of Broiler Chicks against Experimental Infection of *Salmonella Gallinarum*». *Journal of Veterinary Medical Science* 80 (5): 736–40. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0236>.

Li X., Dong Y., Sun Q., Tan X., You C., Huang Y., e Zhou M., 2022. «Growth and Fatty Acid Composition of Black Soldier Fly *Hermetia Illucens* (Diptera: Stratiomyidae) Larvae Are Influenced by Dietary Fat Sources and Levels». *Animals* 12 (4): 486. <https://doi.org/10.3390/ani12040486>.

Liu X., Chen X., Wang H., Yang Q., ur Rehman K., Li W., Cai M., et al., 2017. «Dynamic Changes of Nutrient Composition throughout the Entire Life Cycle of Black Soldier Fly». *PLOS ONE* 12 (8): e0182601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182601>.

López K.P., Schilling M. W. e Corzo A., 2011. «Broiler Genetic Strain and Sex Effects on Meat Characteristics». *Poultry Science* 90 (5): 1105–11. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01154>.

Makkar H. P. S., Tran G., Heuzé V. e Ankers P., 2014. «State-of-the-Art on Use of Insects as Animal Feed». *Animal Feed Science and Technology* 197 (novembre): 1–33. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008>.

Muzzarelli R. A. A., 2010. «Chitins and Chitosans as Immunoadjuvants and Non-Allergenic Drug Carriers». *Marine Drugs* 8 (2): 292–312. <https://doi.org/10.3390/md8020292>.

Oakley B. B., Lillehoj H. S., Kogut M., Kim W. K., Maurer J. J., Pedroso A., Lee M. D., et al., 2014. «The Chicken Gastrointestinal Microbiome». *FEMS Microbiology Letters* 360 (2): 100–112. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12608>.

Pichova K., Nordgreen J., Leterrier C., Kostal L. e Oppermann Moe R., 2016. «The Effects of Food-Related Environmental Complexity on Litter Directed Behaviour, Fear and Exploration of Novel Stimuli in Young Broiler Chickens». *Applied Animal Behaviour Science* 174 (gennaio): 83–89. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.11.007>.

Pieper M., Michalke A., e Gaugler T., 2020. «Calculation of external climate costs for food highlights inadequate pricing of animal products». *Nature Communications* 11 (dicembre): 6117. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19474-6>.

Pitargue F. M., Kim J. H., Goo D., Reyes J. B. D. e Kil D. Y., 2019. «Effect of Vitamin E Sources and Inclusion Levels in Diets on Growth Performance, Meat Quality, Alpha-Tocopherol Retention, and Intestinal Inflammatory Cytokine Expression in Broiler Chickens». *Poultry Science* 98 (10): 4584–94. <https://doi.org/10.3382/ps/pez149>.

Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio, del 28 giugno 2007 , relativo alla produzione biologica e all’etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CEE) n. 2092/91, 189 OJ L § (2007). <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/834/oj/ita>.

Regolamento (CE) n. 889/2008 della Commissione, del 5 settembre 2008 , recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all’etichettatura dei prodotti biologici, per quanto riguarda la produzione biologica, l’etichettatura e i controlli, 250 OJ L § (2008). <http://data.europa.eu/eli/reg/2008/889/oj/ita>.

Regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 maggio 2001, recante disposizioni per la prevenzione, il controllo e l'eradicatione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili, 147 OJ L § (2001). <http://data.europa.eu/eli/reg/2001/999/oj/ita>.

Regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009 , recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano e che abroga il regolamento (CE) n. 1774/2002 (regolamento sui sottoprodotti di origine animale), 300 OJ L § (2009). <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1069/oj/ita>.

Regolamento (CE) n. 1804/1999 del Consiglio, del 19 luglio 1999, che completa, per le produzioni animali, il regolamento (CEE) n. 2092/91 relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e alla indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari, 222 OJ L § (1999). <http://data.europa.eu/eli/reg/1999/1804/oj/ita>.

Regolamento (CEE) n. 1538/91 della Commissione, del 5 giugno 1991, recante disposizioni di applicazione del regolamento (CEE) n. 1906/90 che stabilisce talune norme di commercializzazione per le carni di pollame, 143 OJ L § (1991). <http://data.europa.eu/eli/reg/1991/1538/oj/ita>.

Regolamento (UE) 2021/1372 della Commissione del 17 agosto 2021 che modifica l'allegato IV del regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda il divieto di somministrazione di proteine animali agli animali d'allevamento non ruminanti diversi dagli animali da pelliccia (Testo rilevante ai fini del SEE), 295 OJ L § (2021). <http://data.europa.eu/eli/reg/2021/1372/oj/ita>.

Regolamento (UE) 2017/893 della Commissione, del 24 maggio 2017, che modifica gli allegati I e IV del regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio e gli allegati X, XIV e XV del regolamento (UE) n. 142/2011 della Commissione per quanto riguarda le disposizioni in materia di proteine animali (Testo rilevante ai fini del SEE. ), 138 OJ L § (2017). <http://data.europa.eu/eli/reg/2017/893/oj/ita>.

Regolamento (UE) n. 68/2013 della Commissione, del 16 gennaio 2013 , concernente il catalogo delle materie prime per mangimi Testo rilevante ai fini del SEE, 029 OJ L § (2013). <http://data.europa.eu/eli/reg/2013/68/oj/ita>.

Regolamento (UE) n. 142/2011 della Commissione, del 25 febbraio 2011 , recante disposizioni di applicazione del regolamento (CE) n. 1069/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale e ai prodotti derivati non destinati al consumo umano, e della direttiva 97/78/CE del Consiglio per quanto riguarda taluni campioni e articoli non sottoposti a controlli veterinari alla frontiera Testo rilevante ai fini del SEE, 054 OJ L § (2011). <http://data.europa.eu/eli/reg/2011/142/oj/ita>.

Schiavone A., Dabbou S., De Marco M., Cullere M., Biasato I., Biasibetti E., Capucchio M. T., et al., 2018. «Black Soldier Fly Larva Fat Inclusion in Finisher Broiler Chicken Diet as an Alternative Fat Source». *Animal* 12 (10): 2032–39. <https://doi.org/10.1017/S1751731117003743>.

Shafiq M., Khan M. T., Rehman M. S., Raziq F., Bughio E., Farooq Z., Gondal M. A., et al., 2022. «Assessing Growth Performance, Morphometric Traits, Meat Chemical Composition and Cholesterol Content in Four Phenotypes of Naked Neck Chicken». *Poultry Science* 101 (3): 101667. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101667>.

Singh B., e Dyce K. M., 2018. *Dyce, Sack, and Wensing's Textbook of Veterinary Anatomy*. Fifth edition. St. Louis, Missouri: Saunders.

Sirri F., Castellini C., Bianchi M., Petracci M., Meluzzi A. e Franchini A., 2011. «Effect of Fast-, Medium- and Slow-Growing Strains on Meat Quality of Chickens Reared under the Organic Farming Method». *Animal* 5 (2): 312–19. <https://doi.org/10.1017/S175173111000176X>.

Sjaastad O. V. e Hove K., 2013. *Fisiologia degli animali domestici*. CEA.

Sluis M. V., De Koning B. A. E., De Bruijn A. C. J. M., Velcich A., Meijerink J. P. P., Van Goudoever J. B., Büller H. A., et al., 2006. «Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection». *Gastroenterology* 131 (1): 117–29. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.04.020>.

Taylor S. C., Nadeau K., Abbasi M., Lachance C., Nguyen M., e Fenrich J., 2019. «The Ultimate QPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time». *Trends in Biotechnology* 37 (7): 761–74. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>.

Teirlynck E., Gussem M. D. E., Dewulf J., Haesebrouck F., Ducatelle R., e Van Immerseel F., 2011. «Morphometric evaluation of “dysbacteriosis” in broilers». *Avian Pathology* 40 (2): 139–44. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.543414>.

Tramunt B., Montagner A., Tan N. S., Gourdy P., Réminon H. e Wahli W., 2021. «Roles of Estrogens in the Healthy and Diseased Oviparous Vertebrate Liver». *Metabolites* 11 (8): 502. <https://doi.org/10.3390/metabo11080502>.

Von Borell E. e Sørensen J. T., 2004. «Organic Livestock Production in Europe: Aims, Rules and Trends with Special Emphasis on Animal Health and Welfare». *Livestock Production Science, Trends and Development in Organic Livestock Farming Systems*, 90 (1): 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.07.003>.

Wang J., Clark D. L., Jacobi S. K. e Velleman S. G., 2021. «Supplementation of Vitamin E and Omega-3 Fatty Acids during the Early Posthatch Period on Intestinal Morphology and Gene Expression Differentiation in Broilers». *Poultry Science* 100 (3): 100954. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.12.051>.

Yunus A. W., Razzazi-Fazeli E., e Bohm J., 2011. «Aflatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A Review of History and Contemporary Issues». *Toxins* 3 (6): 566–90. <https://doi.org/10.3390/toxins3060566>.

Zhang K., Hornef M. W. e Dupont A., 2015. «The Intestinal Epithelium as Guardian of Gut Barrier Integrity». *Cellular Microbiology* 17 (11): 1561–69. <https://doi.org/10.1111/cmi.12501>.

### **13. SITOGRAFIA**

E. Corti. s.d. «piumaggio del pollo: pterili e apterili, capo, collo». Consultato 20 maggio 2022. <http://www.summagallicana.it/Volume3/C.XV.a.htm#3>.

«Razze polli: Collo nudo italiana». s.d. Consultato 20 maggio 2022. <https://www.agraria.org/polli/collonudo.htm>.

## **14. RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare la prof.ssa Capucchio, relattrice di questa tesi, per il contributo, il sostegno e la disponibilità che mi sono stati dati durante il periodo necessario per realizzare questa tesi.

Ringrazio la dott.ssa Elena Colombino, correlatrice di questa tesi, per avermi aiutato in qualsiasi occasione, per l'enorme disponibilità dimostrata di fronte anche ai dubbi e problemi più banali.

Ringrazio la dott.ssa Maria Perotti, per avermi assistito, insegnato e consigliato nei momenti più bisognosi dell'intero lavoro.

Ringrazio le dott.sse Marta Gariglio e Valentina Bongiorno e il resto dei colleghi per avermi accolto al centro sperimentale di Carmagnola, per avermi fatto sentire come di casa e per la collaborazione durante la prova sperimentale.

Ringrazio le mie famiglie, quella biologica, e quel gruppo di amici che mi piace pensare di poter ritenere tale, per aver sostenuto e rispettato le mie scelte in tutti questi anni, per avermi sopportato nei momenti duri, per avermi consigliato nelle scelte difficili, e per aver permesso che divenissi la persona che oggi sono fiero di essere.