IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Valutazione dell'impiego di microrganismi simbiotici nell'allevamento di broiler: valutazione dei livelli di contaminazione da *Campylobacter jejuni e* dei possibili effetti sulla composizione delle carni *(CAM-CHAIN)*

E.Di Giannatale, G.Di Serafino, G.Garofolo

Teramo 9 giugno 2015

Progetto EMIDA «CamChain»: partners

Progetto Camchain:struttura

WP1: le interazioni del *Campylobacter jejuni* nel pollo da carne e nell'ambiente di produzione.

WP2: il ruolo degli insetti vettori nella trasmissione del *Campylobacter*.

WP3: riduzione del *Campylobacter* dall'allevamento al mattatoio: interventi e strumenti di sorveglianza.

WP4: studi relativi alla sopravvivenza del *Campylobacter* e sua colonizzazione nell'ambiente e nel processo di macellazione.

WP5: valutazione delle strategie di intervento e strumenti di controllo: guida alle buone pratiche.

WP1: le interazioni del *Campylobacter jejuni* nel pollo da carne e nell'ambiente di produzione

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

- ✓ Caratterizzazione molecolare di ceppi di Campylobacter jejuni isolati in un'area ristretta (temporale e spaziale)
- ✓ Verificato la sensibilità del metodo di isolamento di Campylobacter in allevamento tramite i boot-sooks;

WP5- Strategie di intervento e strumenti di controllo: guida alle buone pratiche

- Austrian Agency for Health and Food Safety, Technikerstraße 70, 6020 Innsbruck, Austria
- ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Ploufragan-Plouzané laboratory, France
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Italy
- Department of Food Hygiene and Environmental Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland
- Technical University of Denmark, Denmark
- University of Liverpool, United Kingdom

Work package 3

Campylobacter reduction from farm to slaughterhouse: interventions and surveillance tools

TASK 3.1.1:TESTING USING BOOT SOCKS

TASK 3.2: ESTIMATION OF FLOCK-LEVEL SENSITIVITY OF DETECTION OF CAMPYLOBACTER ACCORDING TO THE SAMPLING PROCEDURE

TASK 3.3: INTERVENTION MEASURES AGAINST CAMPYLOBACTER BASED ON IMPROVING BROILER GUT HEALTH

TASK 3.3.1: INTERVENTION AT THE EXPERIMENTAL LEVEL

TASK 3.3.2: INTERVENTION AT THE FIELD LEVEL

TASK 3.3.3: INFLUENCE OF PRE- AND PROBIOTICS ON THE NORMAL GUT FLORA

TASK 3.4: INTERVENTION IN THE SLAUGHTERHOUSE

Cosiderazioni generali

- Contenimento delle contaminazioni batteriche a livello della produzione primaria;
- Utilizzo degli antibiotici sempre meno opportuno, essi alterano l'ecologia microbiologica del tratto intestinale (Callaway, Edrington, et al., 2003).
- Con la comparsa della resistenza dei patogeni alimentari agli antibiotici, la ricerca si è concentrata sull'uso di antimicrobici naturali come alternativa per il loro controllo negli animali vivi e alimenti.
- Gli antimicrobici comprendono acidi organici, oli essenziali, estratti vegetali, batteriocine, probiotici, e batteriofagi

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Considerazioni generali

- Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per l'uso dei probiotici e prebiotici (simbiotici) in allevamento
- I probiotici includono i generi **Lactobacillus** , **Bifidobacterium** , Enterococcus, Bacillus, i lieviti , E.coli non patogeno.
- I prebiotici, sono sostanza che, presenti nel cibo, non vengono assorbiti dall'organismo ma utilizzati dalla flora intestinale. Sono nella grande maggioranza carboidrati, in particolare oligosaccaridi.

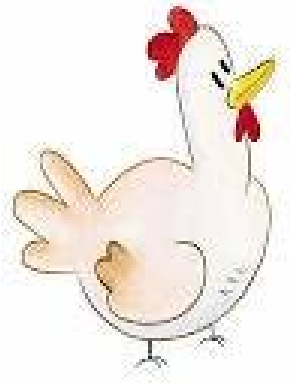
Azione dei probiotici

- influenzano la composizione e la funzione della popolazione microbica intestinale (O'Toole & Cooney, 2008).
- Competono con i patogeni per la stessa nicchia ecologica intestinale, ne impediscono l'attacco all'intestino , sovvertendo l'eventuale processo di infezione (Gaggia et al., 2010).
- alcuni probiotici producono anche batteriocine, che sono peptidi antimicrobici che inattivano gli agenti patogeni.
- stimolano il sistema immunitario (Gill & Prasad, 2008).

Sistemi di controllo alternativi

Intensificare pratiche di biosicurezza in allevamento

Uso di probiotici e prebiotici



Applicazione di batteriocine

Trattamento acqua di bevanda

Uso di batteriofagi

Sviluppo di vaccini

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

TASK 3.3.1: INTERVENTION AT THE EXPERIMENTAL LEVEL

✓Reduction of *C. jejuni*

Feed additive

- ANTIMICROBIAL ACTIVITY vs. *C. jejuni*
- SURVIVAL TO GI CONDITIONS
- SURVIVAL TO INDUSTRIAL PROCESSING
- SAFETY ASSESSMENT

✓ Probiotic Microencapsulated *B. longum* subsp. *longum* PCB133 strain as probiotic in order to obtain an intake of 10^9 CFU of PCB133/day

✓ Prebiotic plus 0.2 % XOS prebiotic

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

ELSEVIER

A *Bifidobacterium*-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain

Loredana Baffoni [a,*], Francesca Gaggìa [a], Diana Di Gioia [a], Cecilia Santini [a], Luca Mogna [b], Bruno Biavati [a]

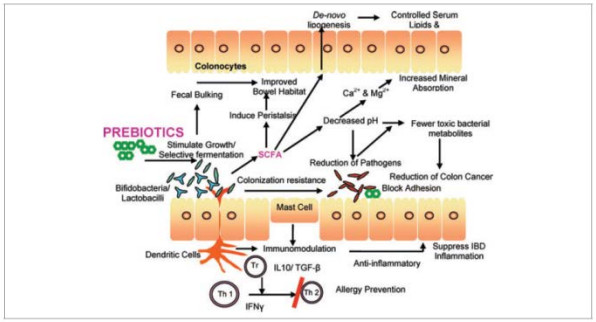


Figure 1–Potential health benefits of prebiotics (source: Aachary 2009).

Experimental set up

160 Ross broiler 1 day old chicks from the local hatchery

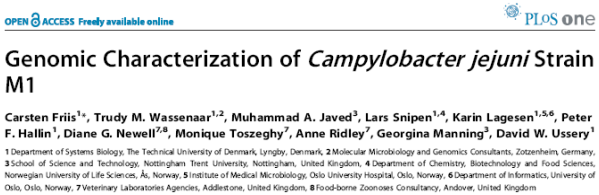
A:
conventional feed

C:
symbiotic blend from day 1

Chicks were orally inoculated with *C. jejuni* M1(10^5 CFU/bird) (per os)

B:
symbiotic blend from day 14

D:
probiotic strain from day 14



OPEN ACCESS Freely available online PLoS one

Genomic Characterization of *Campylobacter jejuni* Strain M1

Carsten Friis[1*], Trudy M. Wassenaar[1,2], Muhammad A. Javed[3], Lars Snipen[1,4], Karin Lagesen[1,5,6], Peter F. Hallin[1], Diane G. Newell[7,8], Monique Toszeghy[7], Anne Ridley[7], Georgina Manning[3], David W. Ussery[1]

1 Department of Systems Biology, The Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark, 2 Molecular Microbiology and Genomics Consultants, Zotzenheim, Germany, 3 School of Science and Technology, Nottingham Trent University, Nottingham, United Kingdom, 4 Department of Chemistry, Biotechnology and Food Sciences, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway, 5 Institute of Medical Microbiology, Oslo University Hospital, Oslo, Norway, 6 Department of Informatics, University of Oslo, Oslo, Norway, 7 Veterinary Laboratories Agencies, Addlestone, United Kingdom, 8 Food-borne Zoonoses Consultancy, Andover, United Kingdom

TASK 3.3.1: INTERVENTION AT THE EXPERIMENTAL LEVEL

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter Laboratorio Nazionale di Riferimento

✓ **Feed additive**

- **Probiotic** 1% microencapsulated *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* PCB133 strain as probiotic in order to obtain an intake of 10^9 CFU of PCB133/day
- **Prebiotic** 0.2 % of Xylooligosaccharide 35%

✓ **Animals** 1-day-old chicks infected with *C. jejuni* M1 ~ 10^5 CFU

170

- GROUP A: conventional feed – control group
- GROUP B: synbiotic product from the 14th day of life
- GROUP C: synbiotic product from the 1st day of life
- GROUP D: probiotic strain from the 14th day of life

Challenge	Check infection				
1 d	5d	10d	20d	30d	39d
		I Sampling	II Sampling	III Sampling	IV Sampling

Gestione dei gruppi

Età dell'animale	Tipologia di mangime
0 – 10 gg	Starter
11 – 21gg	Primo accrescimento
22 – 30 gg	Secondo accrescimento
31 – 35 gg	Finissaggio

Giorno di vita	Temperatura
1 gg	33 °C
4 gg	32 °C
7 gg	31 °C
10 gg	30 °C
13 gg	29 °C
16 gg	28 °C
19 gg	27 °C
22 gg	26 °C
25 gg	25 °C
28 gg	24 °C
31 gg	23 °C
34 gg	22 °C
37 gg	21 °C

Settimane di vita	Ore luce/buio
I sett.	23 h / 1h
II sett. - fine	18 h / 6h

Methods

► La ricerca e numerazione di Campylobacter dal contenuto cecale è stata effettuata mediante metodi ufficiali (Metodo OIE + ISO 10272-1:2006)

► Real Time qPCR del contenuto cecale

– 16s DNA *(Bifidobacterium* spp., *B. longum* subsp. *longum*, *Campylobacter* spp.)

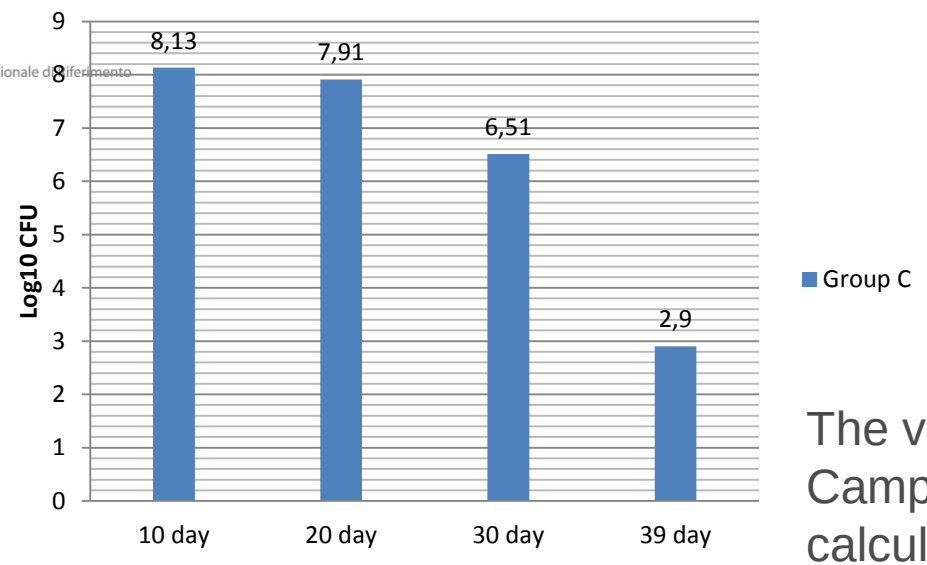
- hipO gene *(C. jejuni)*

Results – Enumeration

	Mean CFU of Campylobacter jejuni per gram of caecal content			
	I	II	III	IV
Group A	$8,3*10^{8}$	$5,4*10^{8}$	$1,1*10^{8}$	$2,1*10^{7}$
Group B	$1,7*10^{8}$	$5,0*10^{8}$	$2,4*10^{7}$	$1,4*10^{6}$
Group C	$2,0*10^{8}$	$1,2*10^{8}$	$1,2*10^{7}$	$3,5*10^{4}$
Group D	1,1*10 8	$1,5*10^{8}$	$5,8*10^{8}$	$2,3*10^{7}$

	Mean log10 CFU of Campylobacter jejuni per gram of caecal content			
	I	II	III	IV
Group A	7,64	8,36	7,1	5,6
Group B	8,03	8,05	7,31	3,8
Group C	8,13	7,91	6,51	2,9
Group D	7,93	8,16	6,21	5,02

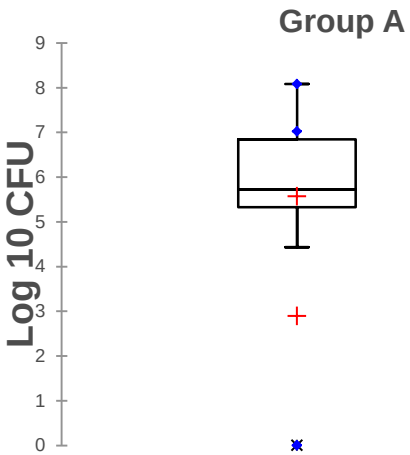
Group C – symbiotic additive from day 1

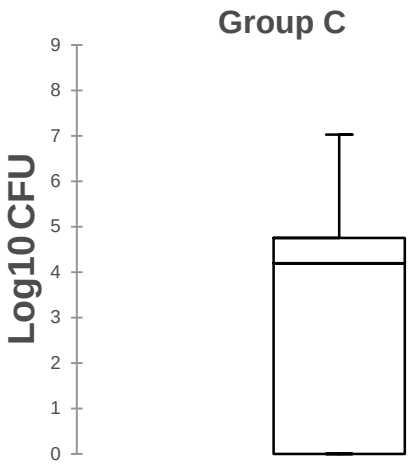


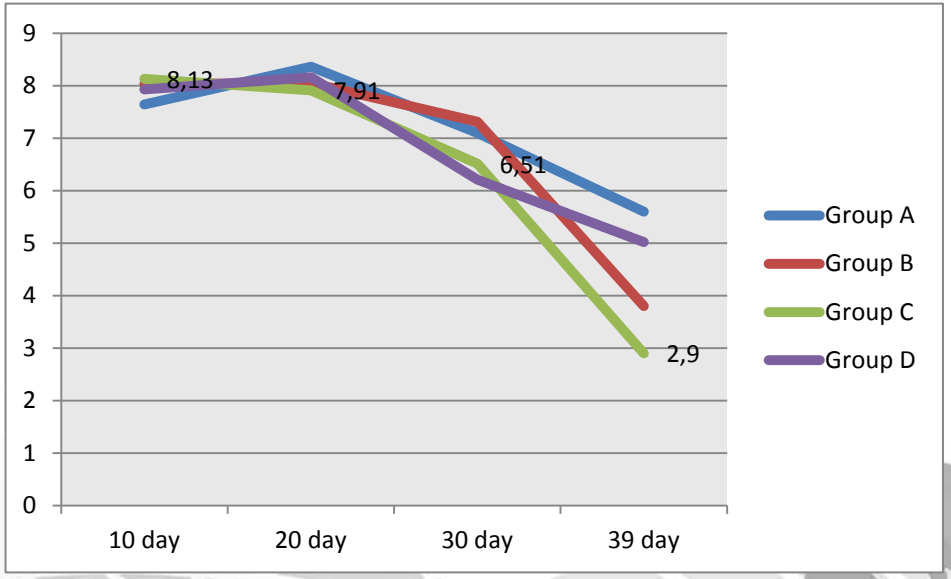
The variability between groups of Campylobacter presence in caeca was calculated using the analysis of variance (ANOVA).

Sampling	Comparison	p-value
1	A~B	0,031
1	**A~C**	**0,020**
1	A~D	0,135
2	A~B	0,156
2	**A~C**	**0,062**
2	A~D	0,266
3	A~B	0,234
3	**A~C**	**0,065**
3	A~D	0,199
4	A~B	0,055
4	**A~C**	**0,004**
4	A~D	0,447

Results (Group A vs Group C)



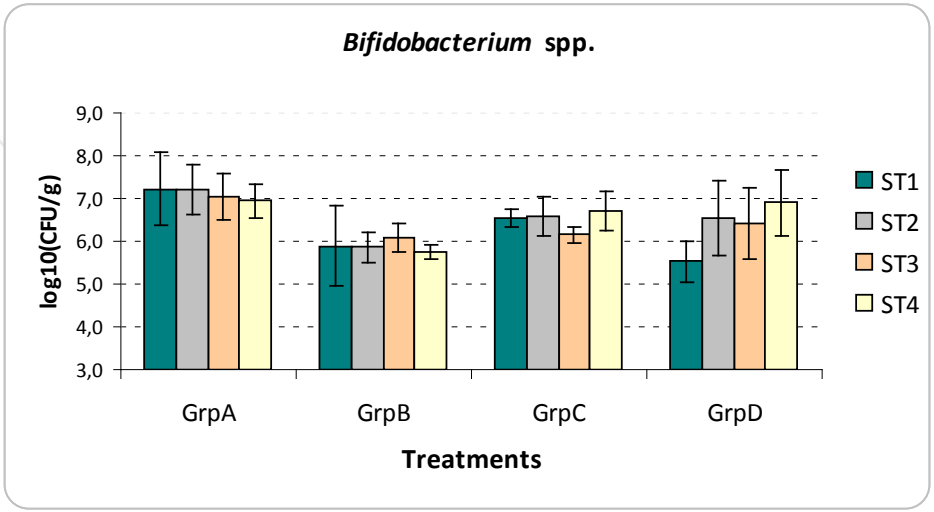


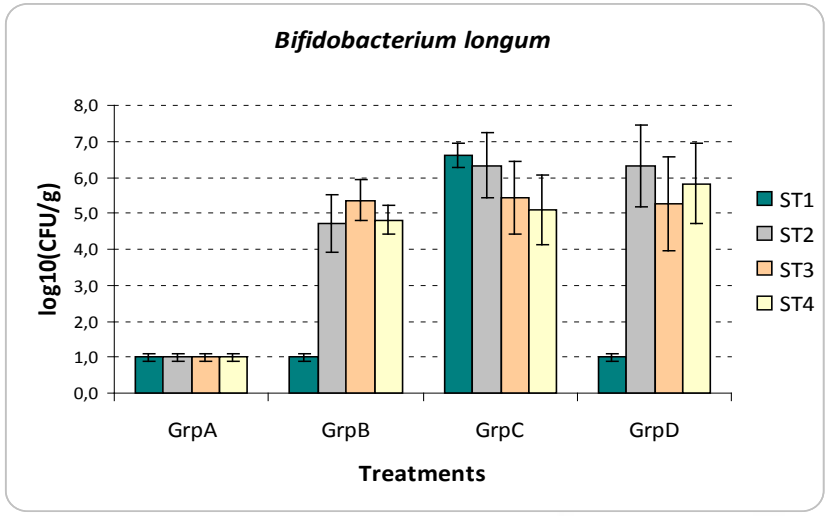


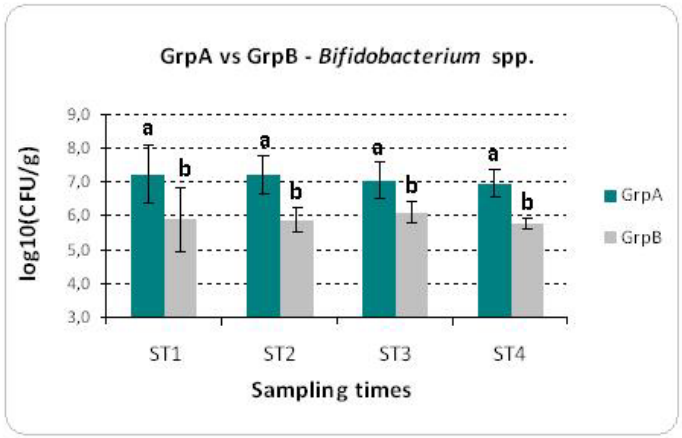
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

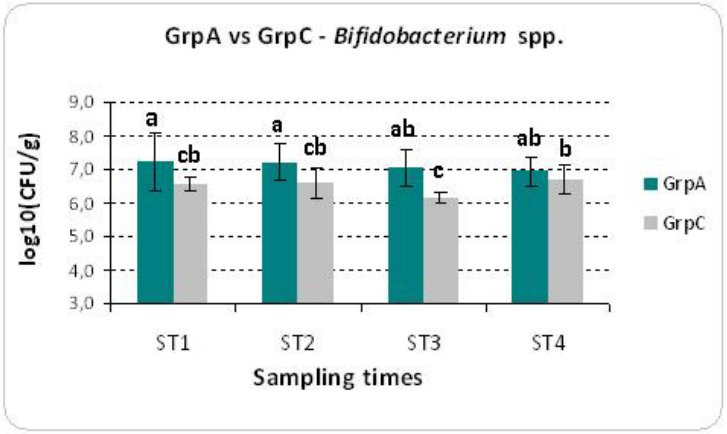
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Bifidobacterium Real time Q PCR







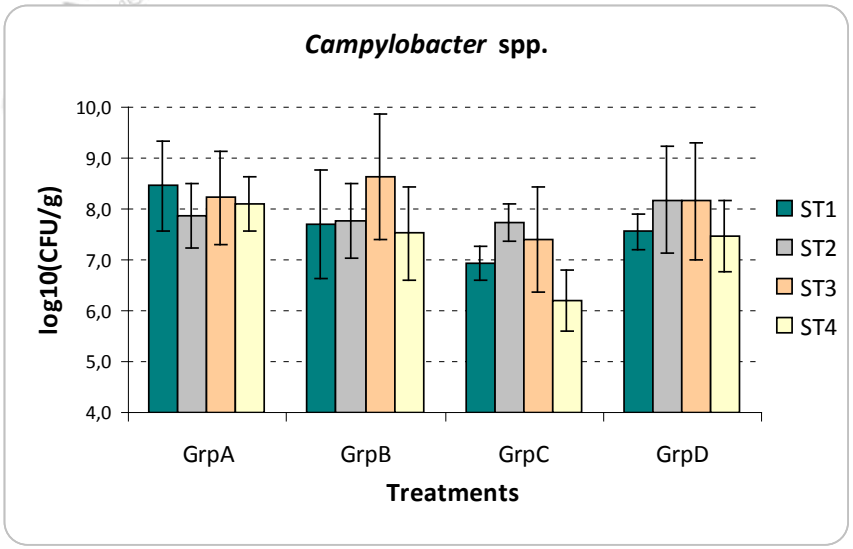


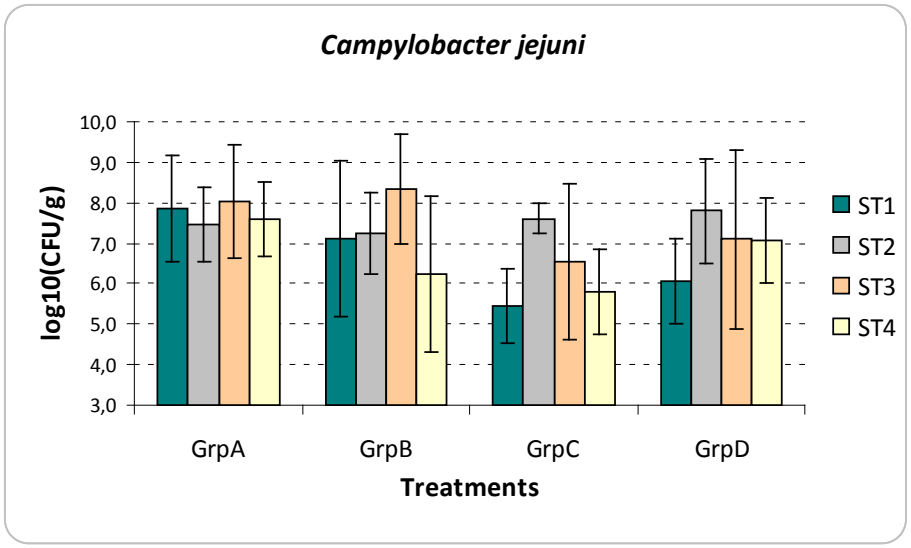
Statistical significances were confirmed by singularly comparing the different treatments with the control group using Duncan

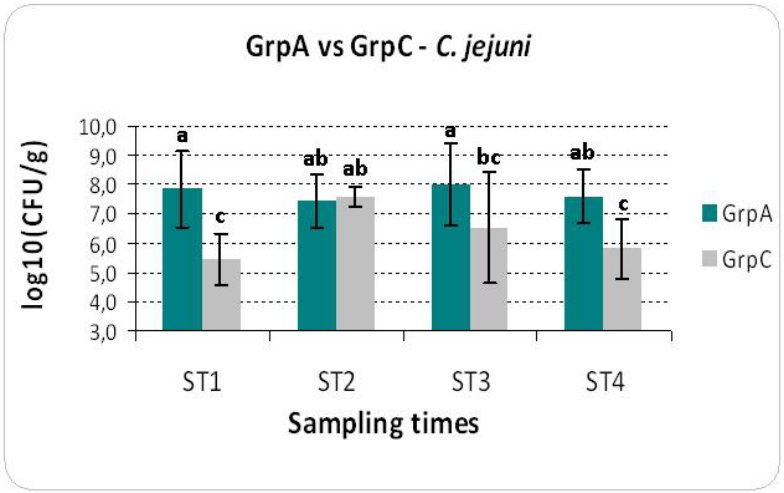
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Campy Real time Q PCR



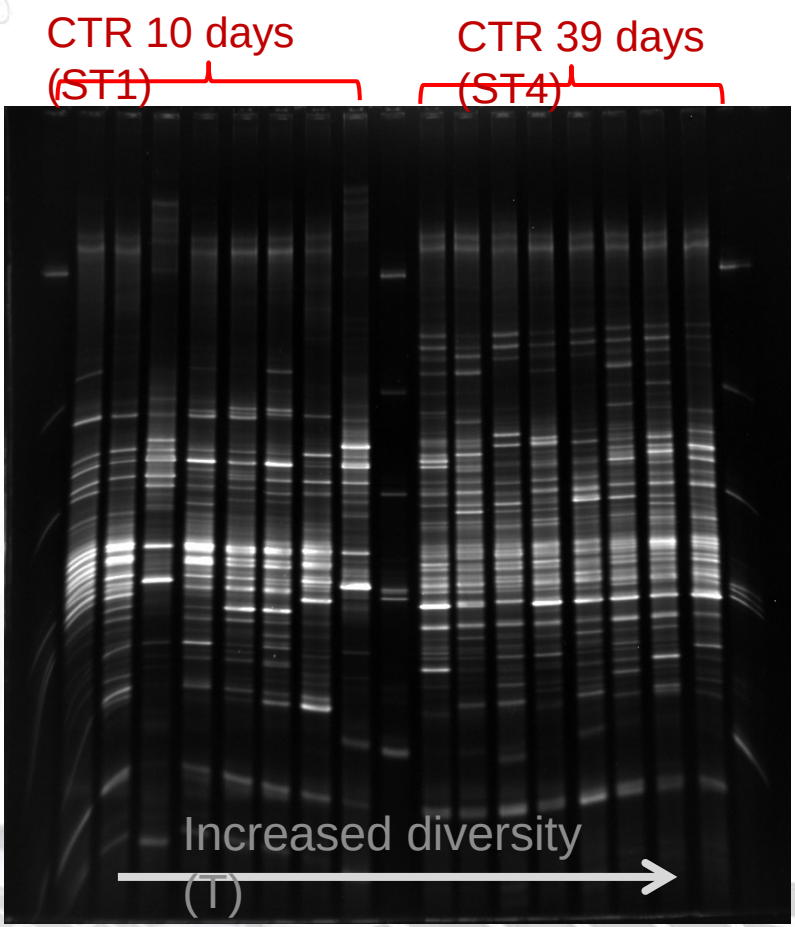


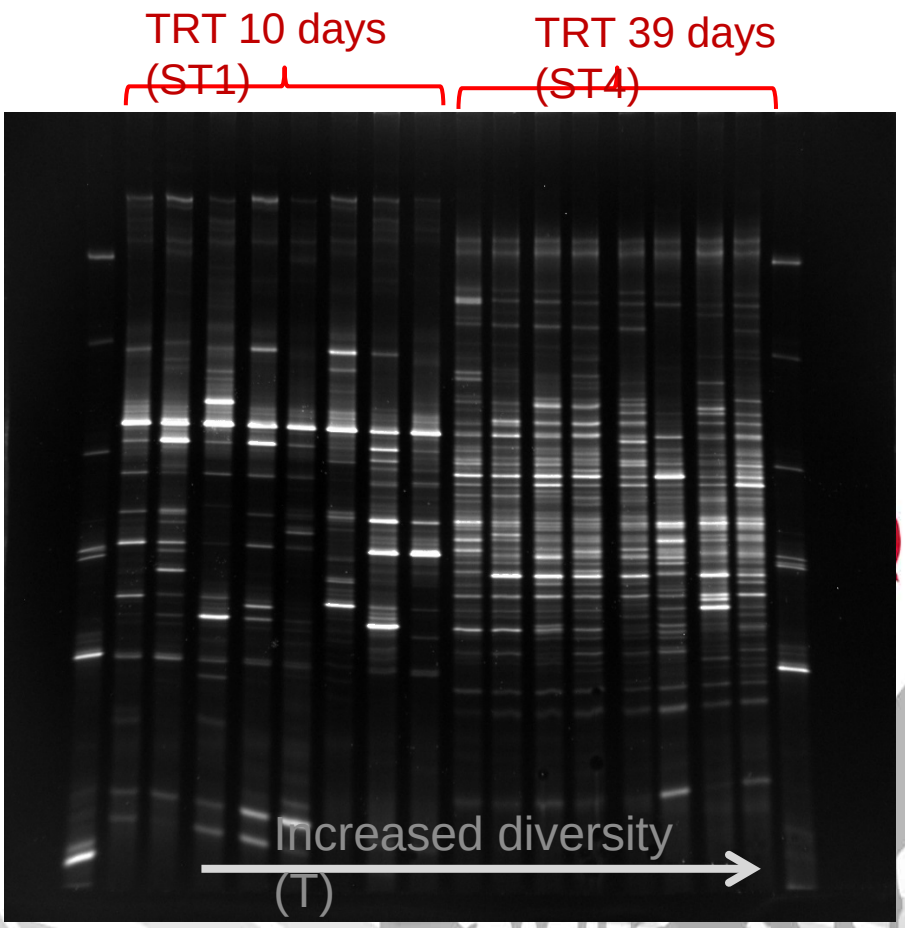


TASK 3.3.3: INFLUENCE OF PRE- AND PROBIOTICS ON THE NORMAL GUT FLORA

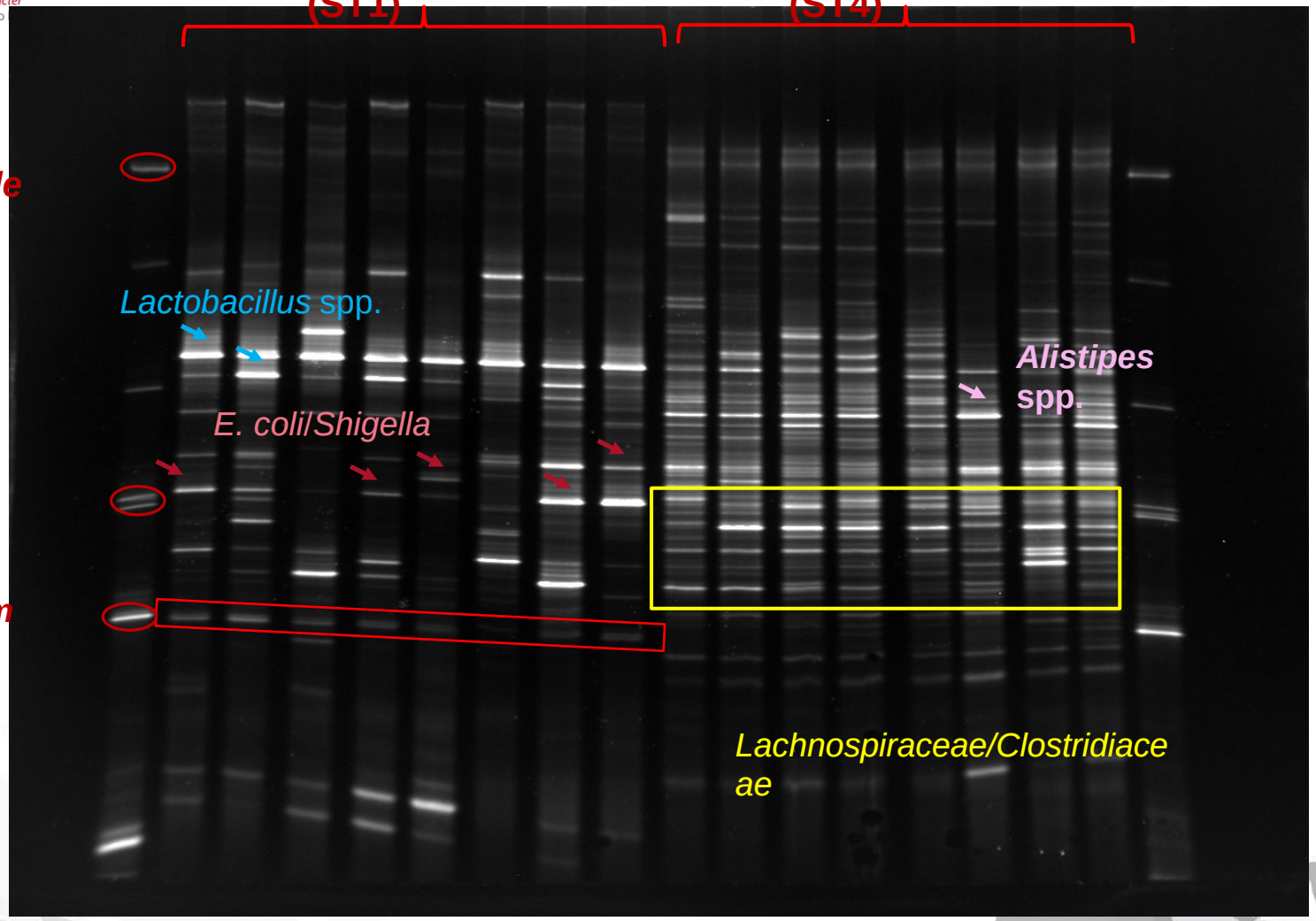
- **DGGE ANALYSIS of POULTRY CAECAL MICROBIOTA with 16S rDNA-targeting primers**

Group A (CTR) and Group C (TRT) at 10 and 39 days of life

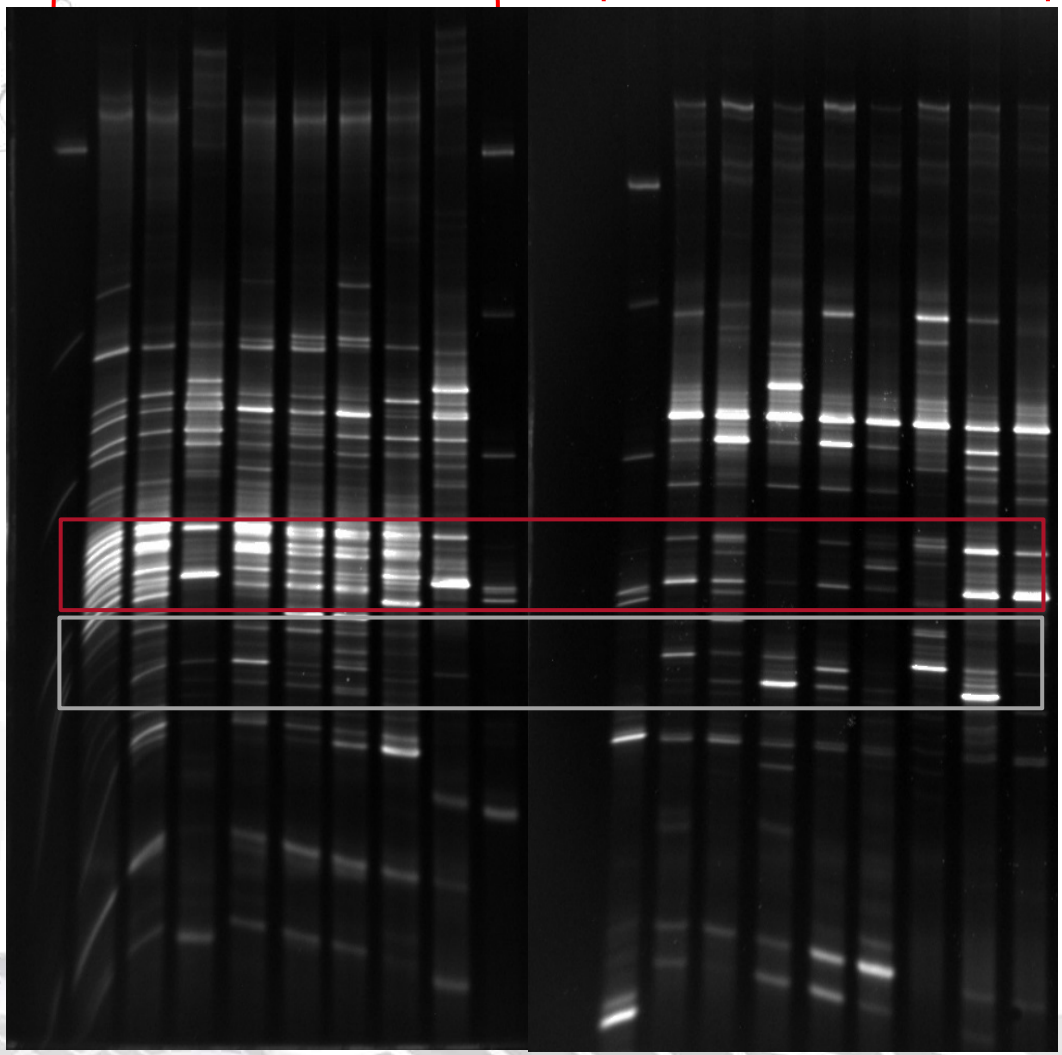




Band Excision and Sequencing – Group C (somministrazione precoce dei probiotici)



Comparison of CTR and TRT group in 10-day old broilers



Reduzione del numero di bande negli animali supplementati

Reduzione nella complessità del microbiota

?

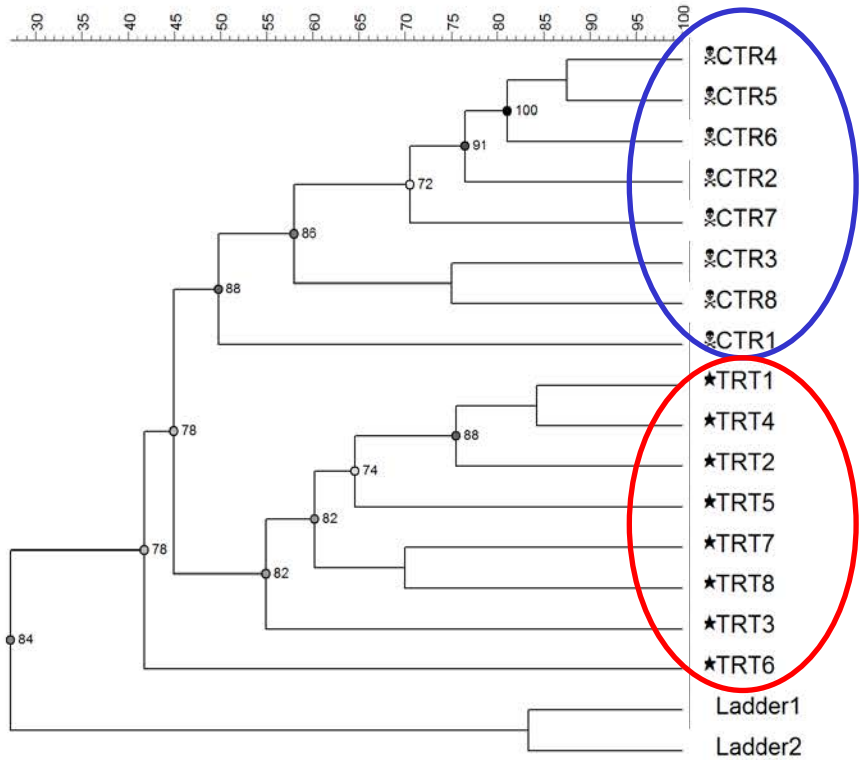
Il gruppo *E. coli/Shigella* sembra essere influenzati dal trattamento precoce con il simbiotico.

Anche i gruppi di *Lachnospiraceae* and *Clostridiaceae* sembrano essere influenzati

ST1 – Cluster Analysis and MDS GelCompare 6.0)

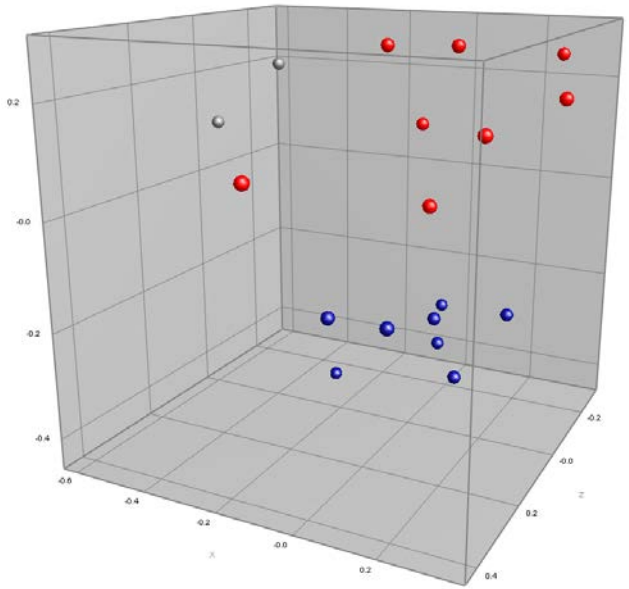
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

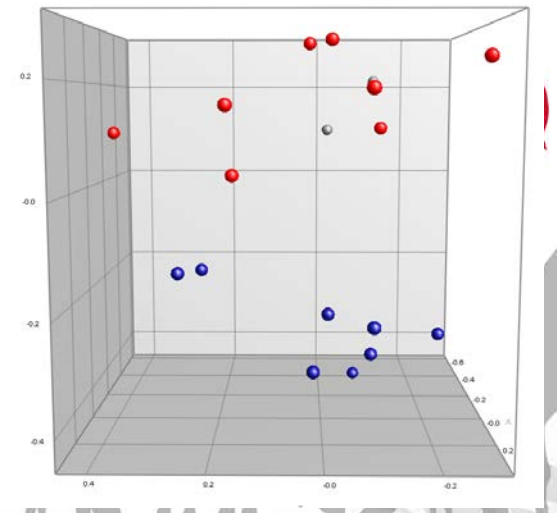
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento



CRT 10 days

TRT 10 days

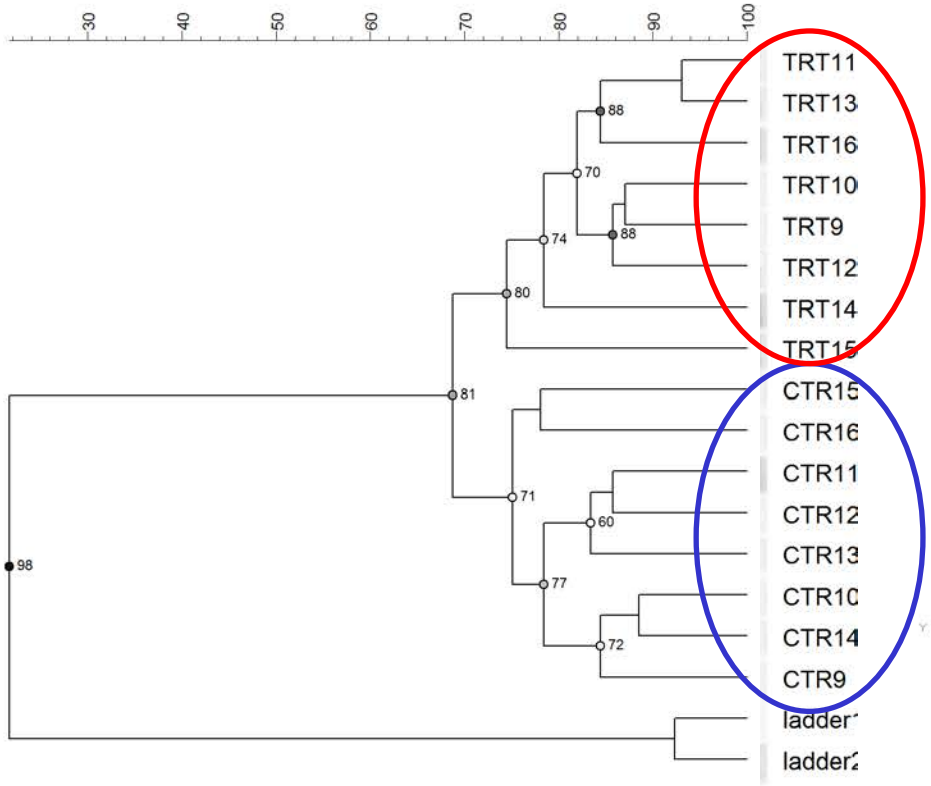


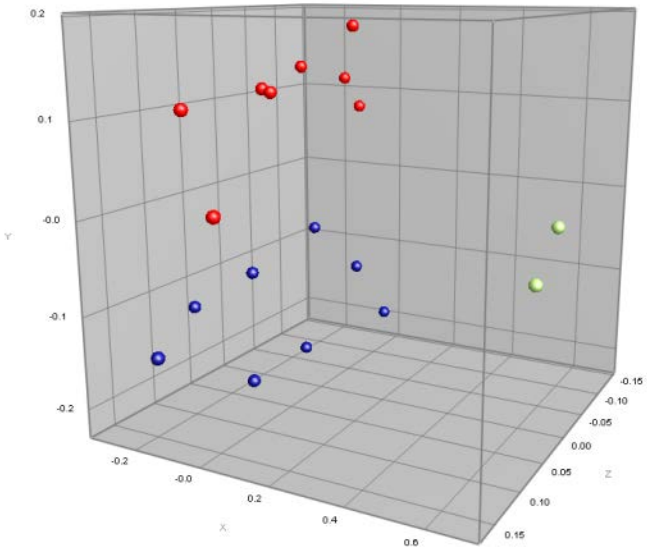


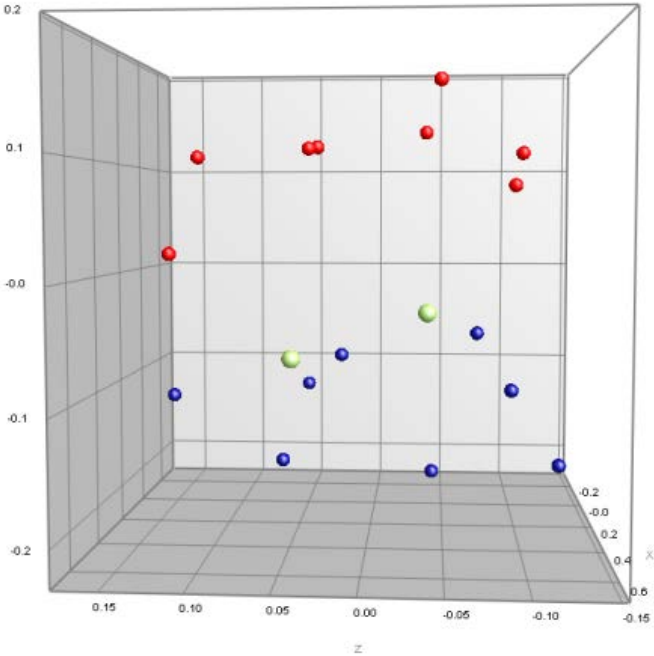
ST4 – Cluster Analysis and MDS GelCompare 6.0)

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

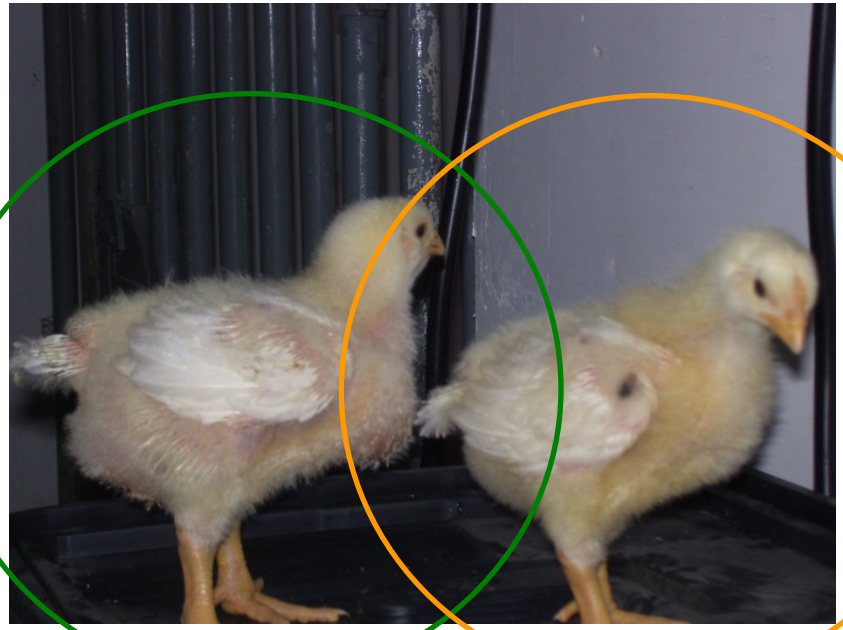






Non solo *Campylobacter*…..

Simbiotici 0 gg



Gruppo controllo

Peso medio II abbattimento

Gruppo A: 940g
Gruppo B: 970g
Gruppo C:1030 g
Gruppo D: 980g

Peso medio IV abbattimento

Gruppo A: 3110 g
Gruppo B: 3230 g
Gruppo C: 3480 g
Gruppo D: 3330 g

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Carne Composizione

Ferro
Selenio
Proteine totali
Colesterolo
Lipidi
Composizione acidica

Acido esadecenoico cis 7	Acidi grassi monoinsaturi	Acido gamma linolenico
Acido miristoleico	Acidi grassi saturi	Acido erucico
Acido docosadienoico cis 13,16	Acido docosaesanoico	Acido eicosadienoico
Acido eicosatrienoico cis 8,11,14	Acido nervonico	Acido gadoleico
Somma Acido arachidonico/Acido eicosatrienoico cis 11,14,17	Acido pentadecanoico	Acido ottadecenoico cis 7
Acido tricosanoico	Acido eicosapentaenoico	Acido stearico
Acido linoleico coniugato (somma degli isomeri)	Acido lignocerico	Acido eptadecanoico
Acido tridecanoico	Acido beenico	Acido palmitoleico
Acido laurico	Acido arachidico	Acido palmitico
Acido caprico	Acido linolenico	Acido butirrico
Acido caprilico	Acido miristico	Acido oleico
Acido caproico	Acido linoleico	Acidi grassi poliinsaturi

IZSAM G.CAPORALE TERAMO
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Risultati composizione

Accertamento	Metodo	GRUPPO A	GRUPPO B	GRUPPO C	GRUPPO D	Unità Misura
Ferro	ICP-AES	4,1	5,3	4,1	3,7	mg/Kg
Selenio	ICP-MS	0,11	0,11	0,0091	0,11	mg/Kg
Proteine totali	KJELDAHL	23,1	22,73	23,39	23,64	% su tal quale
Colesterolo	GC	72	66	68	67	mg/100g
Lipidi	Gravimetrico	1,03	1,57	**0,93**	1,46	% su tal quale
Composizione acidica	Gas cromatografia	**Nessuna differenza fra i gruppi**				

TASK 3.3.2: INTERVENTION AT THE FIELD LEVEL

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

- Esperimento in campo in corso
- L'allevamento è situato in Abruzzo ed è formato da 3 capannoni, ognuno con 2 box
- Le dimenzioni dei gruppi seguiti sono di 10.000 animali ciascuno
- Età di macellazione prevista 30-42 giorni

Feed:

Synbiotic da giorno 1

Conclusion

- Accordo fra metodi Microbiologici e molecolari
- I risultati mostrano una riduzione effettiva della contaminazione da *Campylobacter jejuni* negli animali trattati con il synbiotico (>2 $\log_{10}$).
- Considerando l'alta dose infettante nei pulcini di 1 giorno il prodotto ha mostrato l'effetto solo quando supplementato da giorno 0.
- Un risultato interessante riguarda l'elevato numero di Bifidobatteri endogeni nel gruppo di controllo che sono inefficaci nel ridurre la carica C. jejuni nei caeca rispetto al probiotico B. longum subsp. longum PCB133.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Conclusion

- **Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)** per testare il microbiota intestinale mostra una reale incidenza del symbiotico nell'arco di vita con una riduzione della complessità del microbiota, con particolare influenza sui gruppi *E.coli/Shigella* e *Lachnospiraceae/Clostridium*

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Grazie