



Seminario Laboratori Nazionali di Riferimento *Campylobacter* e *Listeria monocytogenes*

Teramo 11-13 Dicembre 2013

Probiotici e prebiotici nell'alimentazione dei broiler: l'esperienza del progetto europeo "Pathogen Combat"

Dott.ssa Francesca Gaggia
Dott.ssa Loredana Baffoni

Dip. Scienze Agrarie - Microbiologia
Alma Mater Studiorum, Bologna

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

IL PRESENTE MATERIALE È RISERVATO AL PERSONALE DELL'UNIVERSITÀ DI BOLOGNA E NON PUÒ ESSERE UTILIZZATO AI TERMINI DI LEGGE DA ALTRE PERSONE O PER FINI NON ISTITUZIONALI

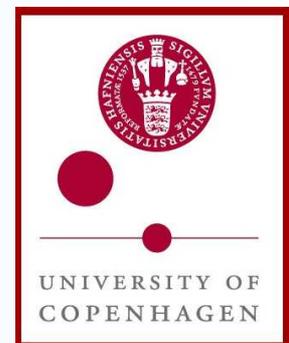
PathogenCombat

Controllo e prevenzione di patogeni emergenti a livello cellulare e molecolare nella catena alimentare.

Mogens Jakobsen
Università di Copenhagen



*Food Quality
and Safety*





PathogenCombat: obiettivi

**Fornire nuove essenziali
informazioni e nuovi metodi
all'industria e alle autorità su come
ridurre la prevalenza di nuovi e
ri-emergenti patogeni alimentari**

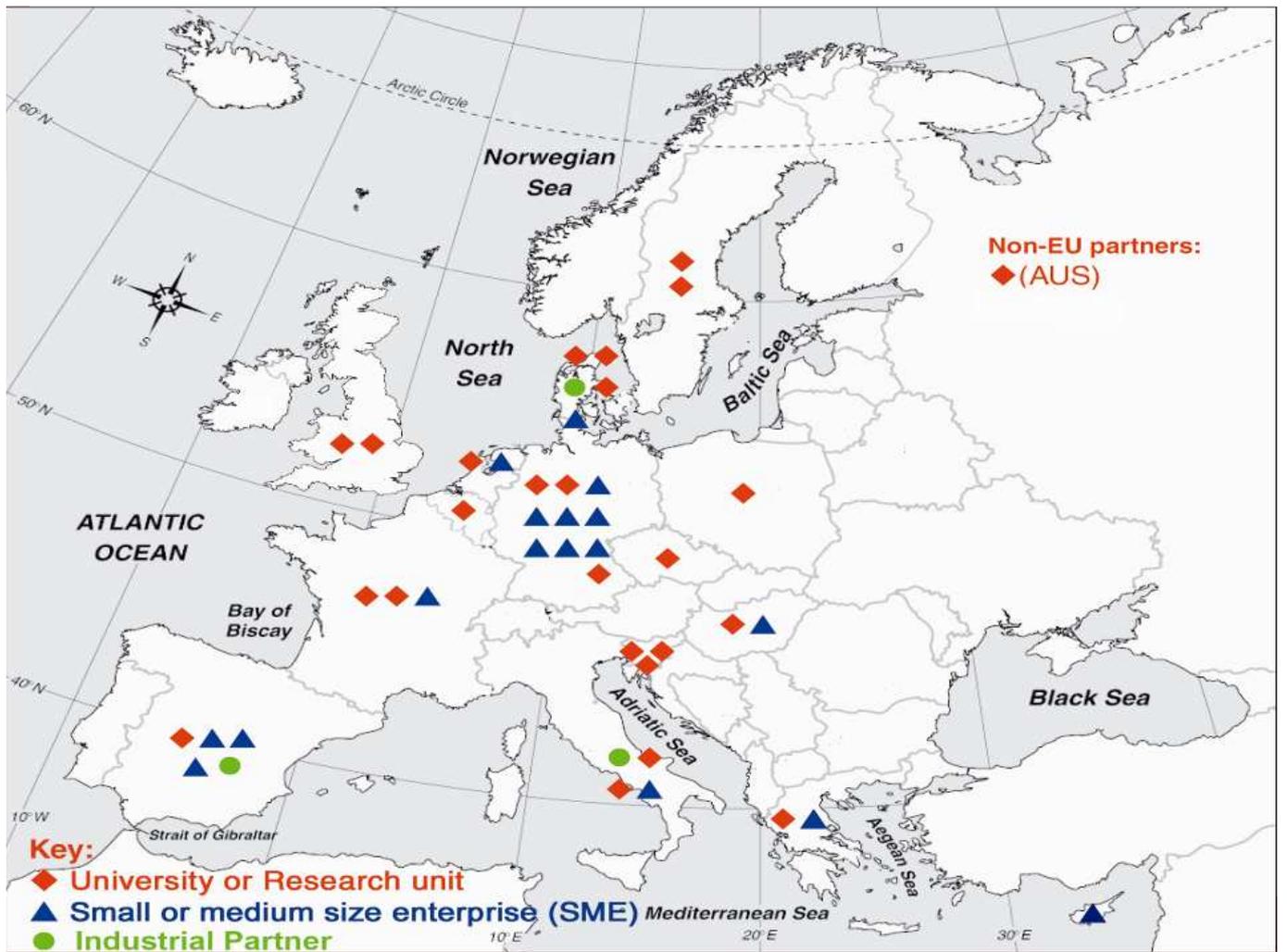
2005 - 2010

www.pathogencombat.com

Food Quality and Safety



ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



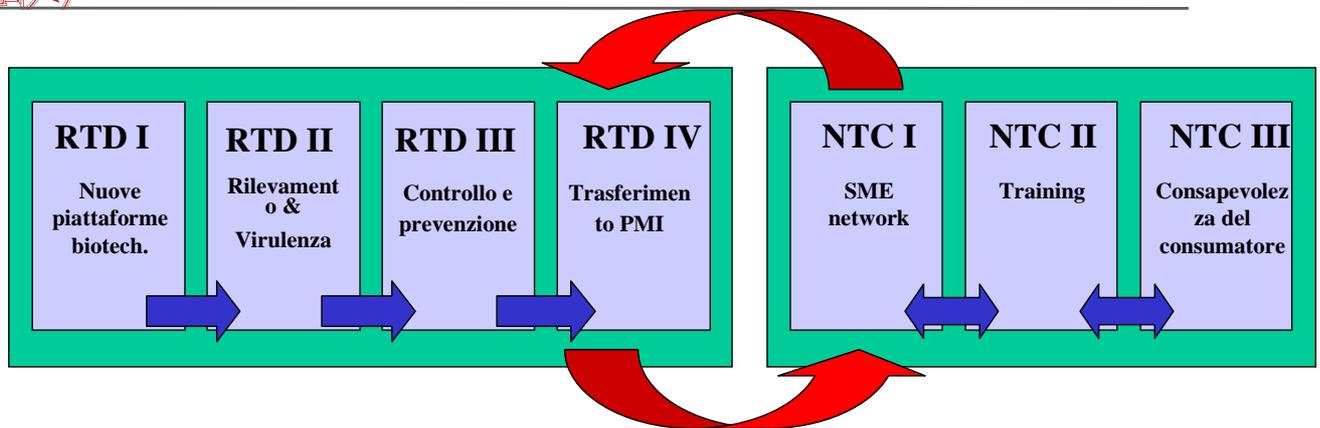


I Patogeni nel PathogenCombat

Bacteria	Gram+: <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> (MAP)
	Gram-: <i>Campylobacter jejuni</i> & shiga-like toxin producing <i>Escherichia coli</i> (STEC)
Yeast	Invasive variants of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Fungi	An ochratoxin A producing filamentous fungus (<i>Penicillium nordicum</i>)
Viruses	Hepatitis E (HEV) & tickborne encephalitis (TBEV) virus
Heat stable bacterial toxins	<i>Staphylococcus aureus</i>



PathogenCombat – Overview



- Nuove piattaforme di studio a livello di singola cellula
- Metodi di rilevazioni dei patogeni rapidi e affidabili
- Chiudere il GAP fra tecnologia e igiene
- Interventi per il controllo e la prevenzione dei patogeni
- Trasferimento alle PMI



RTD III - Controllo & Prevenzione

**Screening di microrganismi
probiotici da utilizzare in campo
animale in combinazione con
ingredienti prebiotici**



**U
N
I
B
O**

RTD IV - Applicazione

**Applicazione *in vivo* su polli broiler
di probiotici e prebiotici selezionati e valutazione
dell'impatto sul microbiota intestinale**



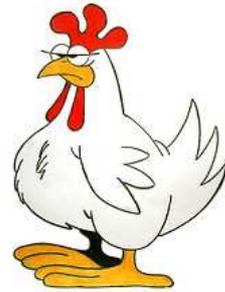


PROBIOTICI NEGLI ANIMALI

“Microrganismi vitali che, ingeriti in adeguate quantità, conferiscono proprietà benefiche all’ospite, senza necessariamente colonizzare il tratto gastrointestinale”

FAO/WHO, (2002)

- Favoriscono l’equilibrio del microbiota intestinale
- **Maggior resistenza a patologie infettive**
- Migliore assorbimento dei nutrienti
- Aumento nella produzione e qualità delle uova
- Aumento nella produzione di latte e qualità
- Aumento del tasso di crescita





PROBIOTICI

Sono stati usati fin dall'inizio della storia dei fermenti lattici
Sono presenti in quasi tutti i prodotti fermentati (vegetali, carne e latticini)
Hanno una lunga storia di consumo e di uso sicuro
Possono far parte del microbiota naturale, sia negli animali che nell'uomo.



Lactobacillus
spp.



Bifidobacterium
spp.



Lieviti



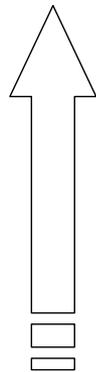
Enterococcus
faecium



Bacillus spp.



CRITERI DI SELEZIONE DI UN PROBIOTICO



Trial *in vivo*

Modulazione Sist. Immunitario – citotossicità

Capacità di aderire all'epitelio

Attività antimicrobica vs patogeni target

Resistenza al tratto gastrointestinale

Resistenza alla produzione e conservazione

Antibiotico resistenza

Identificazione tassonomica



PREBIOTICI

NEGLI ANIMALI

In base al numero di monomeri legati tra loro i prebiotici possono così essere classificati:

- Disaccaridi
- Oligosaccaridi (3-10 monomeri)
- Polisaccaridi

Prebiotici più comunemente utilizzati

- ☑ Lattulosio
- ☑ Inulina
- ☑ Frutto-oligosaccaridi (FOS)
- ☑ Galatto-oligosaccaridi (GOS)
- ☑ Transgalatto-oligosaccaridi (TOS)
- Xilo-oligosaccaridi (XOS)



La modulazione del microbiota intestinale tramite la dieta può essere ottenuta mediante somministrazione per via orale di

Composti prebiotici

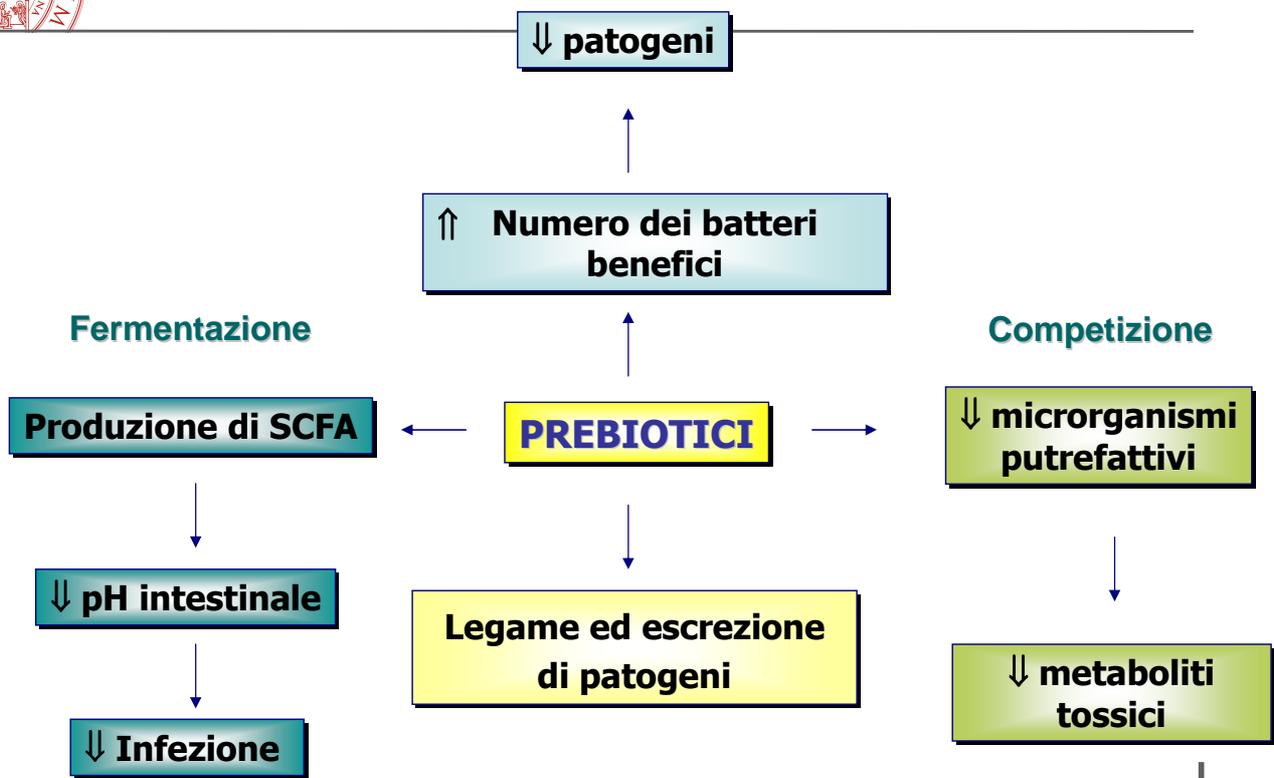
Il concetto di "prebiotico" fu proposto per la prima volta da Gibson e Roberfroid nel 1995:



"ingredienti fermentati selettivamente che inducono specifici cambiamenti sia nella composizione che nell'attività del microbiota gastrointestinale, apportando benefici per il benessere e la salute dell'ospite"



PREBIOTICI NEGLI ANIMALI: meccanismi





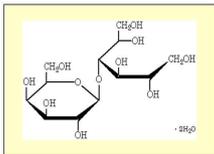
Probiotici e prebiotici in mangimi: alternative all'uso di antibiotici

~~ANTIBIOTICI~~

regolamento n. 1831/2003 CE

PROBIOTICI (es: bifidobatteri, lattobacilli)

- Modulazione microbiota
- Inibizione patogeni
- Performance dell'animale
- Digeribilità nutrienti



PREBIOTICI (es: FOS, GOS, XOS)

- Modulazione del microbiota (batteri "benefici")
- Substrati per la fermentazione
- Produzione di prodotti finali della fermentazione
- Effetti benefici nel lume intestinale

SINBIOTICI

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



CRITERI DI SELEZIONE DI UN PROBIOTICO

UNIBO

~ 100 ceppi testati



- Trial in vivo
- Modulazione Sist. Immunitario – citotossicità
- Capacità di aderire all'epitelio
- Attività antimicrobica vs patogeni target
- Resistenza al tratto gastrointestinale
- Resistenza alla produzione e conservazione
- Antibiotico resistenza
- Identificazione tassonomica

1 ceppo (*L. plantarum*)
con attività anti-*Mycobacterium*

11 ceppi (bifidobatteri, lattici)
con attività anti-*Campylobacter*

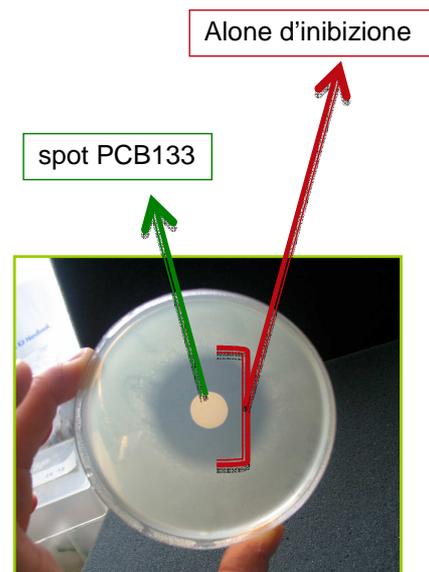


SPOT AGAR TEST

Attività antimicrobica di PCB133 contro due ceppi di *C. jejuni*

C. jejuni CIP 70.2^T
Ø = 3.3 cm

C. jejuni 221/05
Ø = 4.07 cm





CONCLUSIONI dello SCREENING *IN VITRO*

Ceppi individuati per lo studio *in vivo*:

- ✓ ***B. longum* subsp. *longum* PCB133**
- ✓ ***L. plantarum* PCS20**



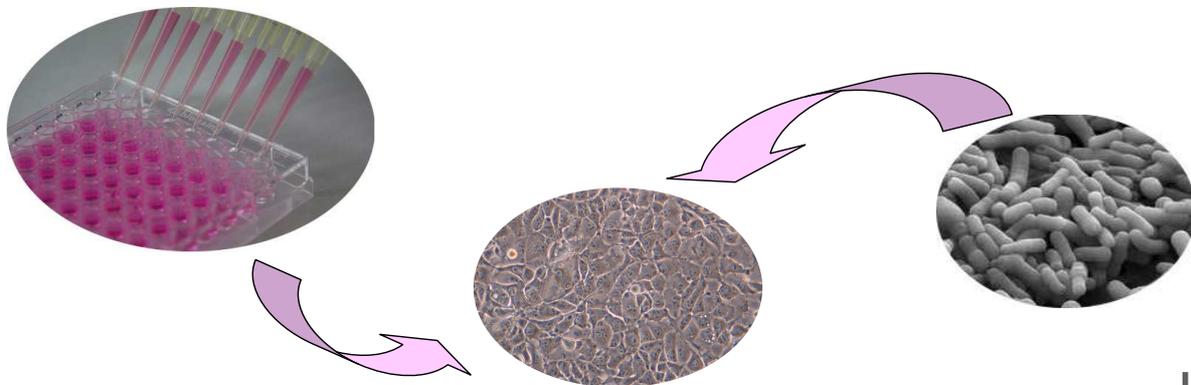


TEST SU LINEE CELLULARI DI POLLO



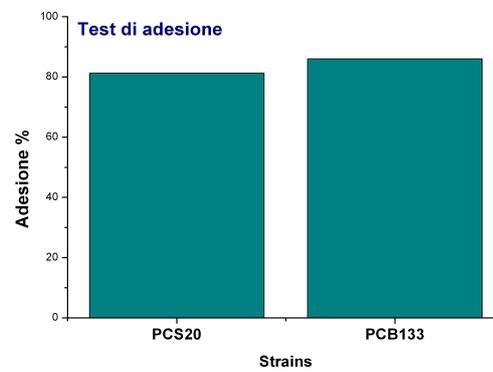
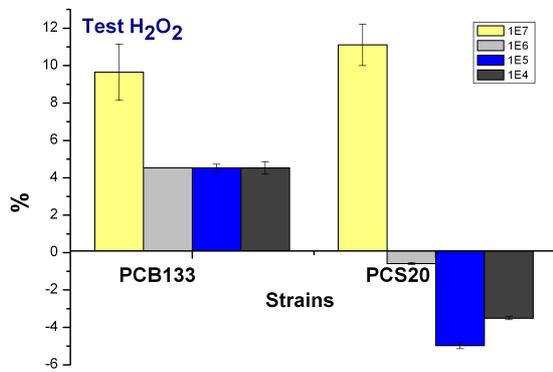
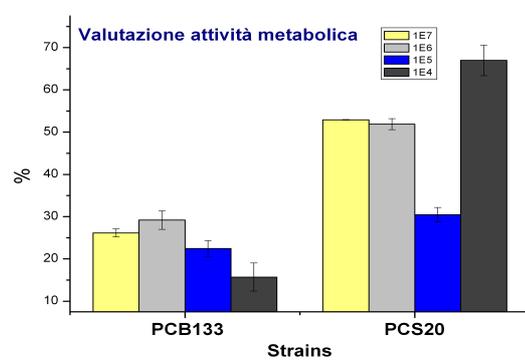
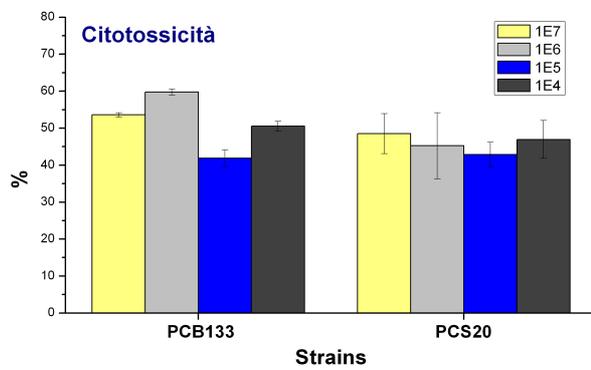
Università di Maribor ⇒ Isolamento e stabilizzazione di linee cellulari intestinali normali da uomo e da animali per studi di interazione *in vitro*

Cellule B1OXI : Linee cellulari di pollo da intestino tenue





RISULTATI su PCB133 e PCS20





Probiotici e Prebiotici in polli broiler : *STUDIO in vivo*

1 2 STUDI PILOTA IN VIVO

- Probiotici
- Prebiotici

- Trial con PCS20 e PCB133
- Trial con FOS e GOS

2 1 STUDIO PILOTA IN VIVO

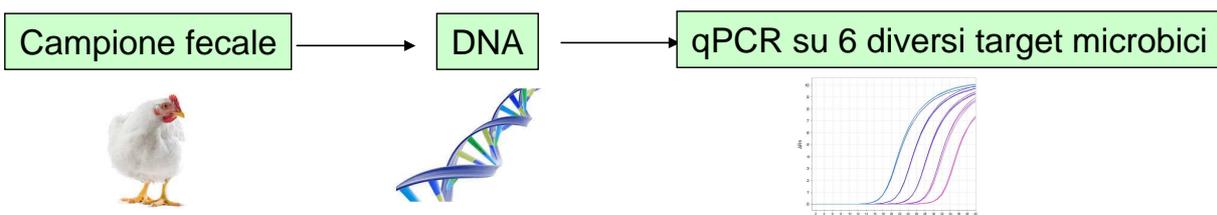
- formulazione SINBIOTICA



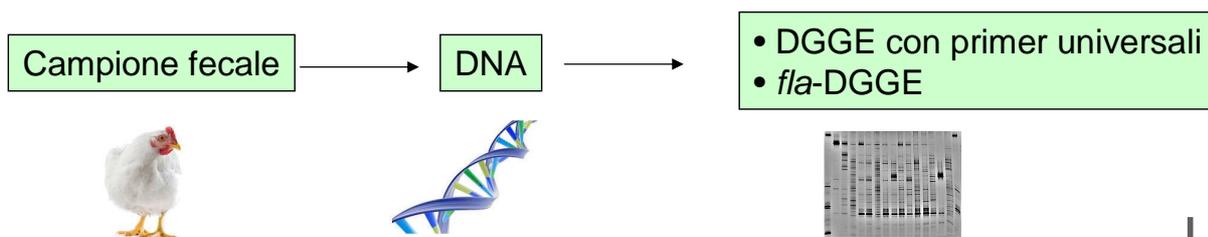


RISULTATI riguardanti i TRIAL *in vivo*

1. Trial e analisi in PCR quantitativa (qPCR) su specifici gruppi microbici



2. Dati preliminari sullo studio di popolazione tramite DGGE





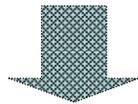
TRIAL *IN VIVO*

- Broiler suddivisi in gabbie
- Cibo ed acqua *ad libitum*
- Monitoraggio delle condizioni ambientali e del peso
- Campionamento (10 animali per gruppo):

T0 – prima della somministrazione

T1 – dopo 15 gg di somministrazione

T2 – 7 giorni da fine somministrazione



Campioni fecali immediatamente processati





ANALISI dei CAMPIONI: qPCR

Campioni fecali



Estrazione DNA



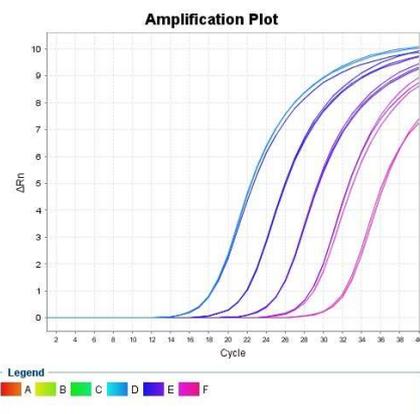
qPCR analysis



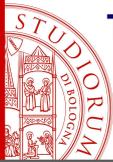
• Chimica SybrGreen

Targets

Bifidobacterium spp.
B. longum subsp. *longum*
Lactobacillus plantarum
Campylobacter spp.
C. jejuni
Lactobacillus spp.



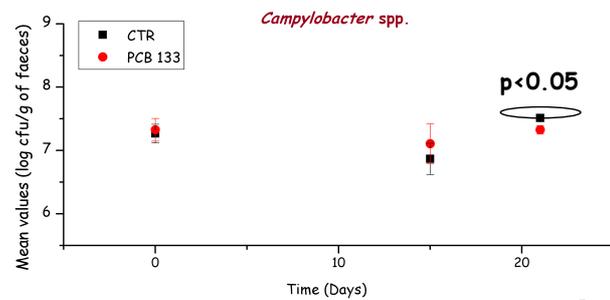
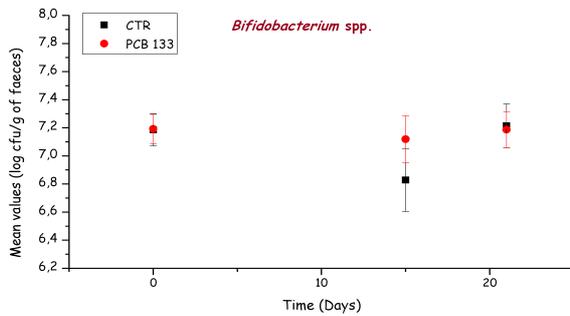
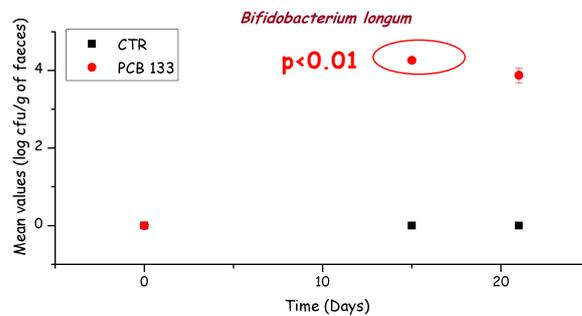
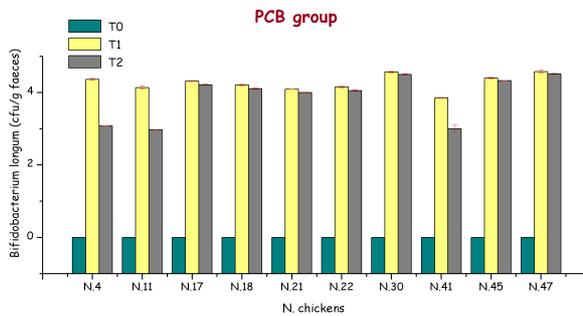
* ANOVA con proc GLM software SAS



TRIAL PROBIOTICI : risultati

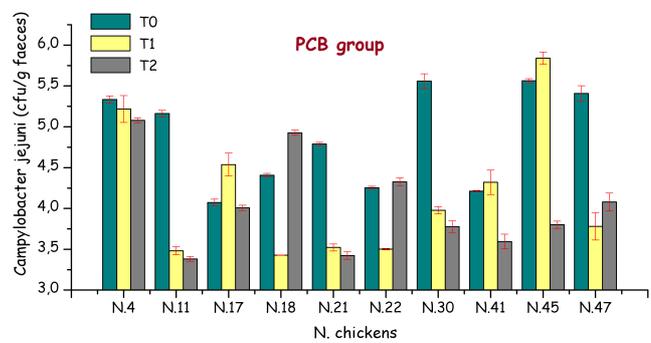
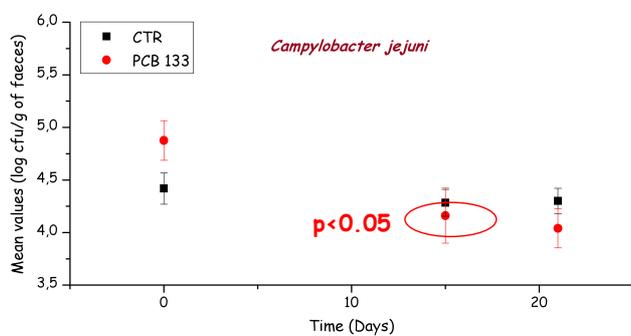
Somministrazione Probiotici
(~10⁸ ufc/ml tramite gavage)

Bifidobacterium longum PCB133
Lactobacillus plantarum PCS20





TRIAL PROBIOTICI : risultati



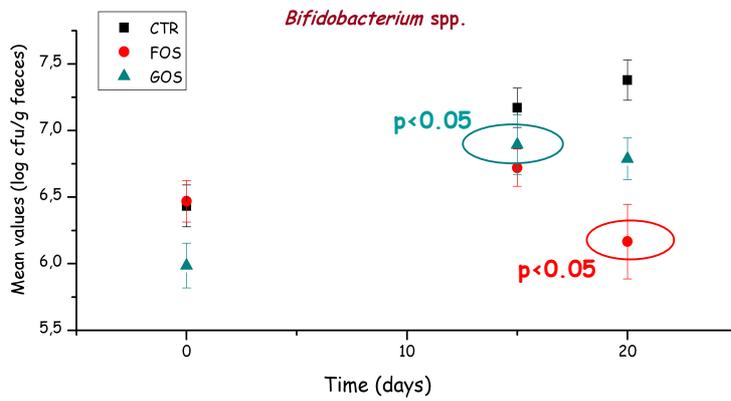
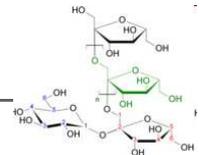
- *L. plantarum* non riscontrato tramite qPCR
- *B. longum* PCB133 riscontrato in tutti gli animali trattati
- Diminuzione significativa ($p < 0.05$) di *C. jejuni* nel gruppo trattato con PCB133
- Nessuna differenza significativa nel peso degli animali



TRIAL PREBIOTICI : risultati

- Somministrazione di prebiotici

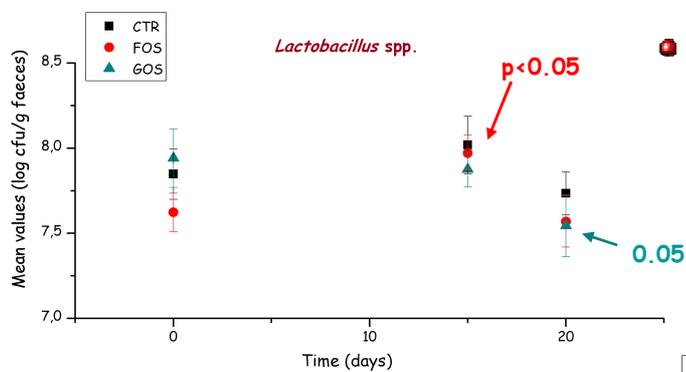
Frutto-oligosaccaridi FOS (Actilight) 0.5 %
Galatto-oligosaccaridi GOS (CUP Oligo P) 3%



- Alta variabilità a T0
- Aumento dei bifidobatteri totali con GOS

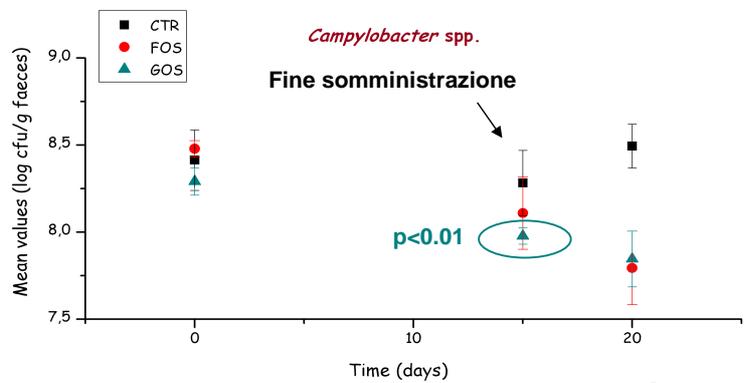


TRIAL PREBIOTICI : risultati



● Aumento dei lattobacilli totali con FOS

● Decremento di *Campylobacter spp.* nei gruppi trattati





Conclusioni Preliminari:

- ✦ *Bifidobacterium longum* PCB133 mostra persistenza nel tratto GI
 - ✦ Diminuzione significativa di *C. jejuni*
- } Gruppo PCB133

- ✦ Aumento dei bifidobatteri ($p < 0.05$)
 - ✦ Diminuzione di *Campylobacter* spp. ($p < 0.01$)
- } Gruppo GOS

SCELTA ? ➔ *B. longum* PCB133 + GOS

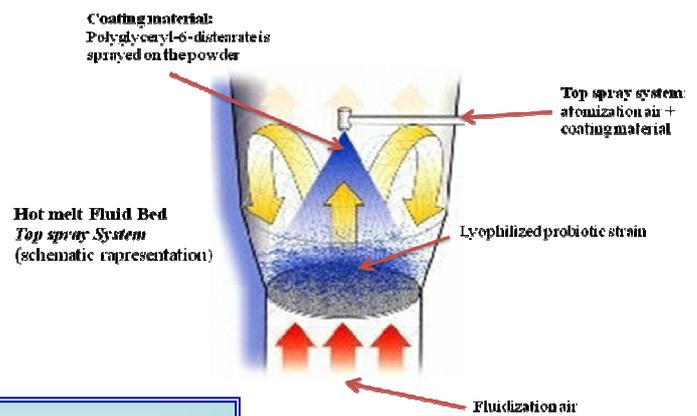


MICROINCAPSULAZIONE

B. longum subsp. *longum* PCB133 fornito micro-incapsulato da Probiotal S.p.A. (Novara)

Metodologia di microincapsulazione:

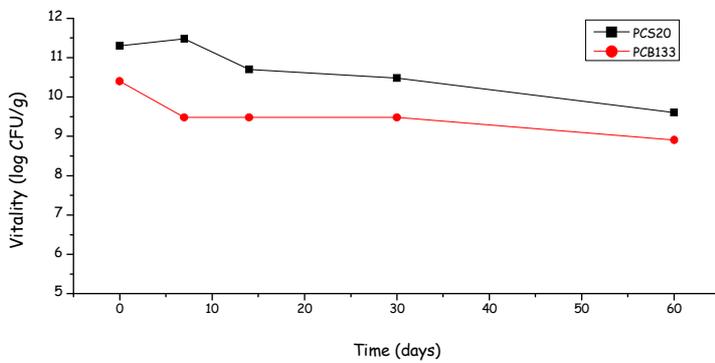
Top spray system – rivestimento lipidico



- ❖ Migliore sopravvivenza al transito gastrico
- ❖ Migliore sopravvivenza nel mangime a t ambiente



Valutazione della sopravvivenza del probiotico microincapsulato

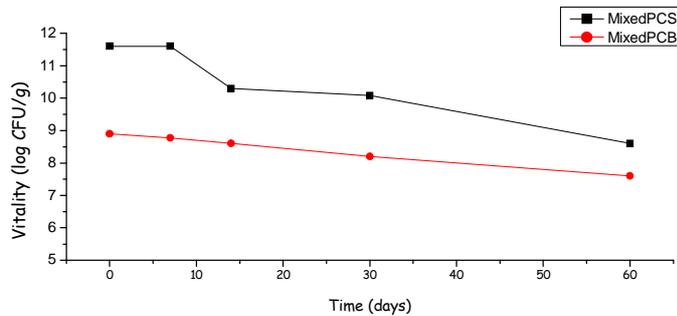


Prodotto microincapsulato:

Microbac PCB133 e PCS20 : > 1 x 10⁹ ufc/g (Probiotical S.p.A.)

- Temperatura ambiente

	T0	T7	T14	T30	T60
PCS20 UFC/g	11,3	11,5	10,7	10,5	9,6
PCB133 UFC/g	10,4	9,5	9,5	9,5	8,9



- Mangime:Microbac = 50:50

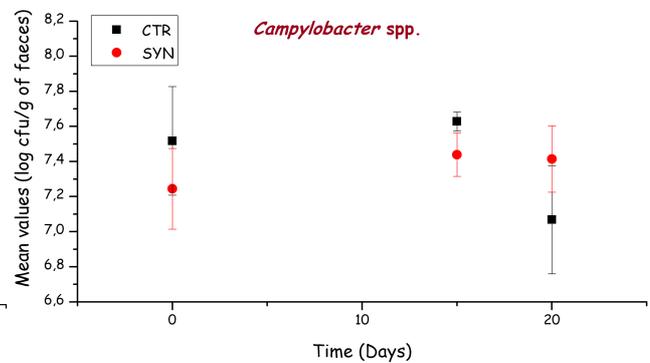
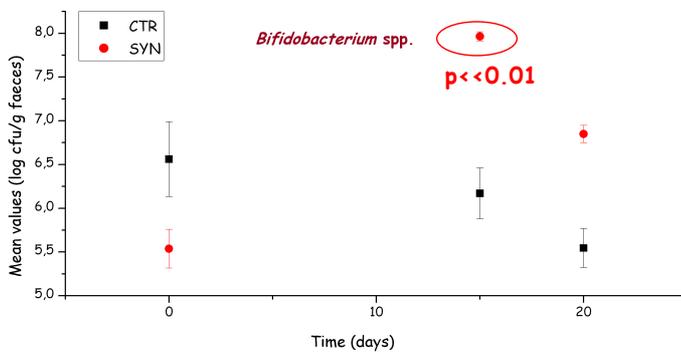
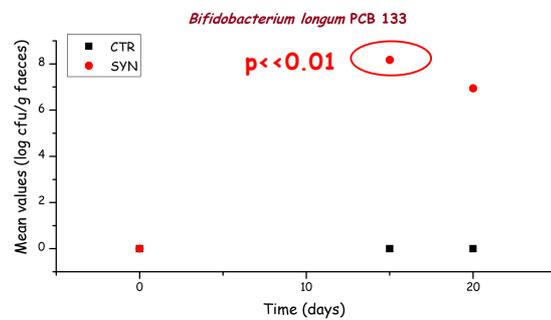
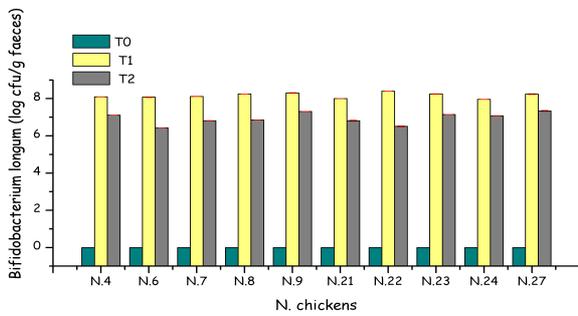
- Temperatura ambiente

	T0	T7	T14	T30	T60
Mixed PCS UFC/g	11,6	11,6	10,3	10,1	8,6
Mixed PCB UFC/g	8,9	8,8	8,6	8,2	7,6



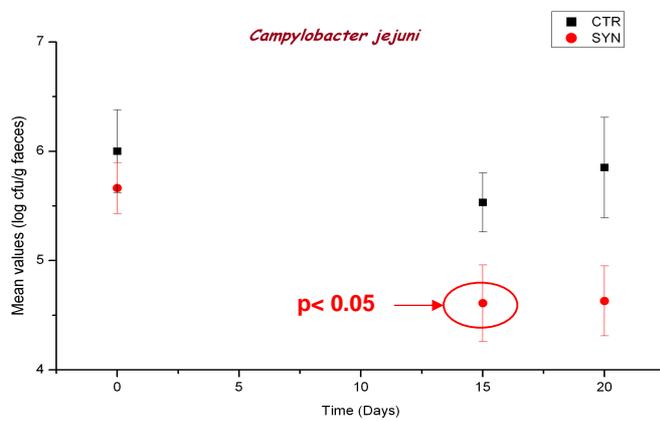
TRIAL SINBIOTICO:

Galacto-oligosaccharides GOS (CUP Oligo P) 3% + *Bifidobacterium longum* PCB133 microbac 1%





TRIAL SINBIOTICO:



- Differenze di peso non significative
- Alta variabilità intragruppo per *C. jejuni* (numero di animali limitato)



Trattamento SYN: Conclusioni Analisi Quantitativa

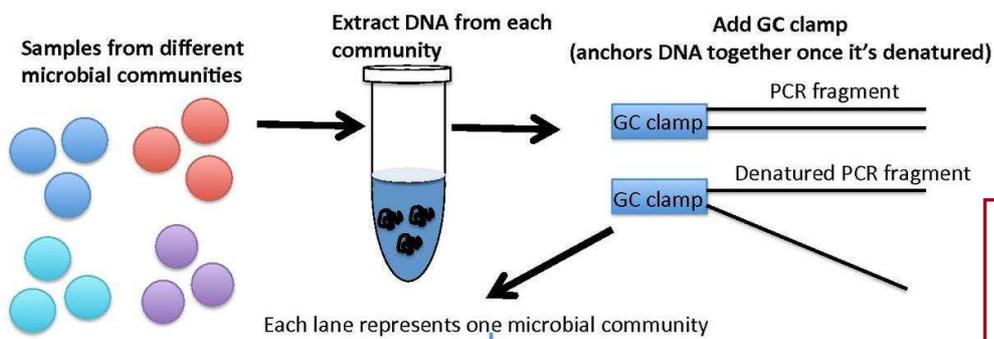
- ✦ Microincapsulazione efficace nel proteggere il ceppo durante il transito gastrico
- ✦ *B. longum* PCB133 mostra una buona persistenza nell'intestino
- ✦ Aumento della popolazione totale dei bifidobatteri
- ✦ Diminuzione significativa di *C. jejuni*





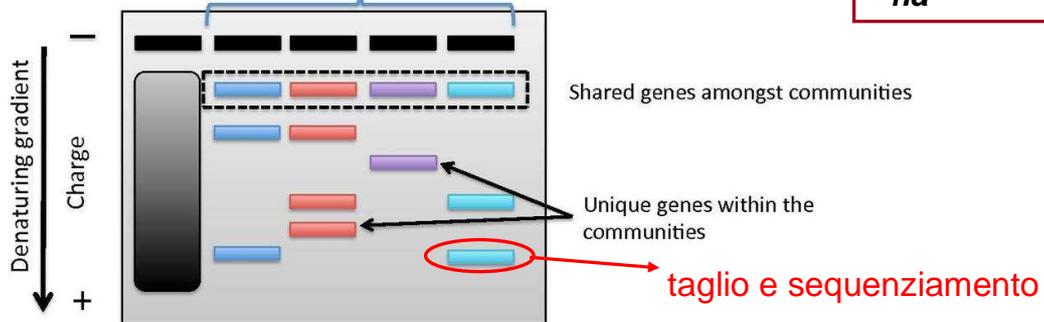
ANALISI dei CAMPIONI: DGGE (elettroforesi su gel a gradiente denaturante)

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis



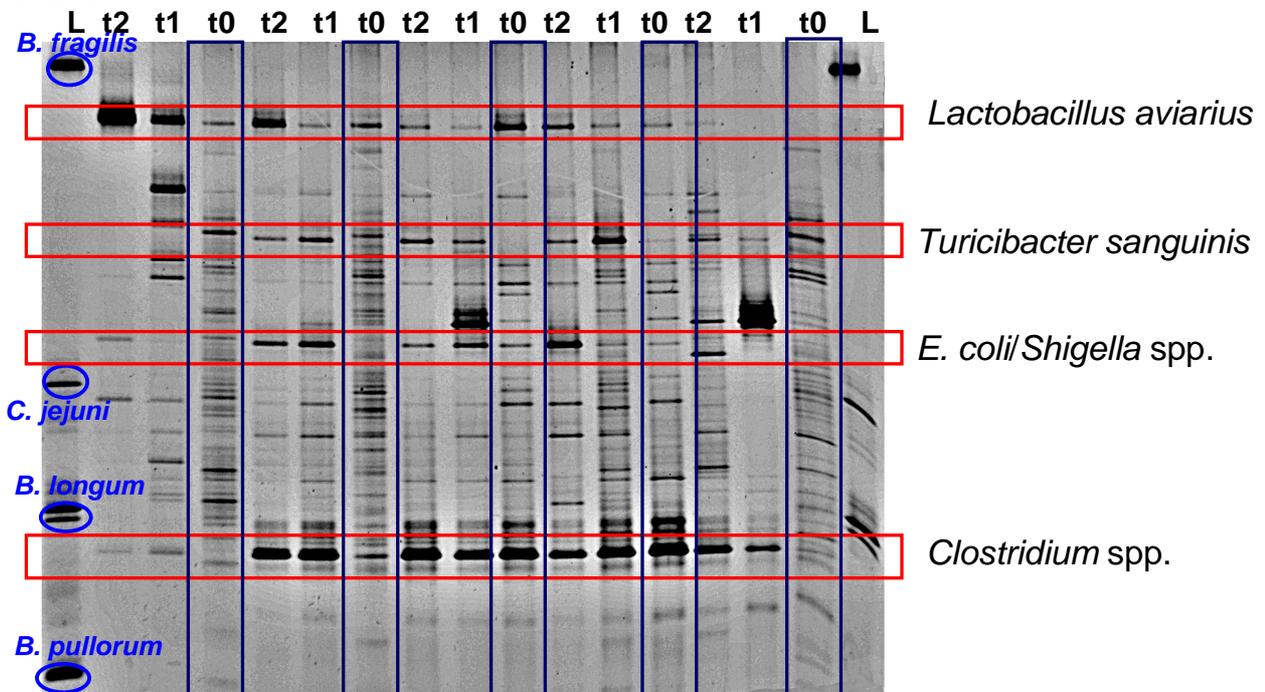
Primer:

- Universali HDA
- *fla*



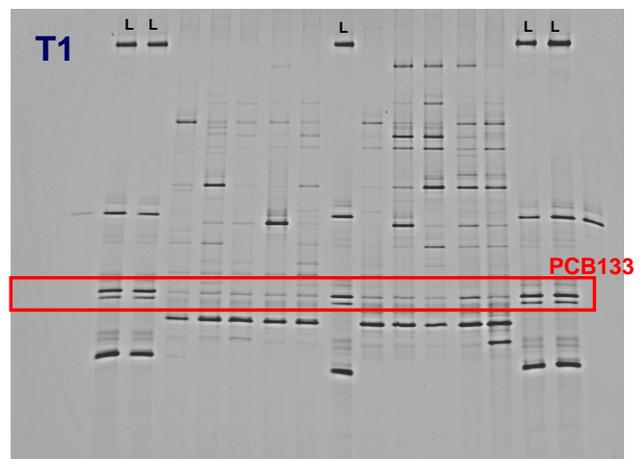
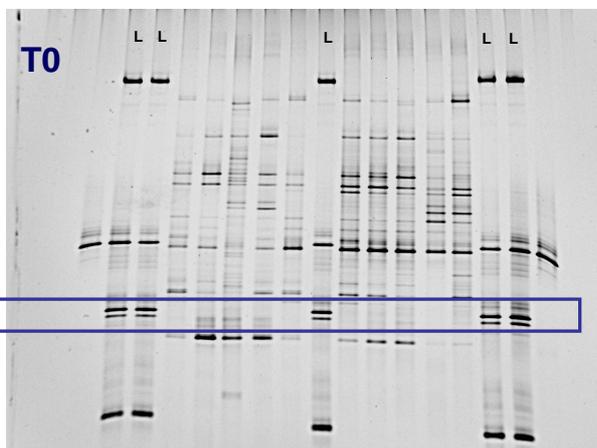


Dati preliminari: studio di popolazione tramite DGGE





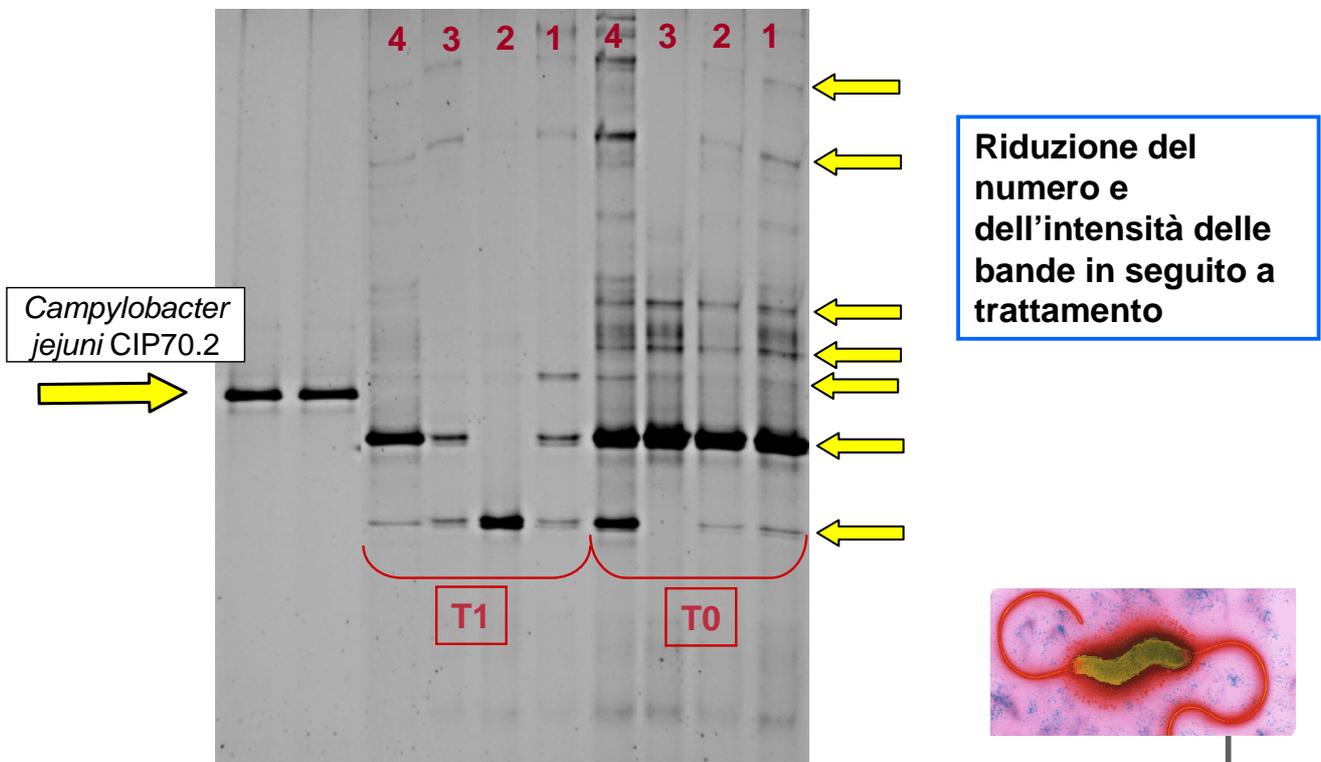
Dati preliminari: valutazione del sinbiotico tramite DGGE



- *B. longum* PCB133 riscontrato in tutti gli animali trattati (>1%)
- Nessuna banda tagliata corrispondente a *Campylobacter* spp.



Gruppo SYN, *fla*-DGGE: primer per il gene *flaA*

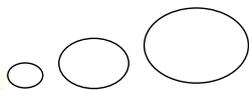
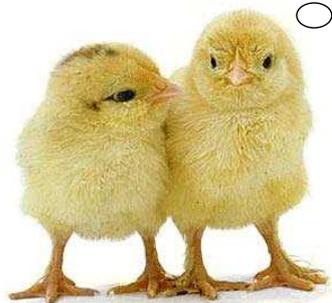
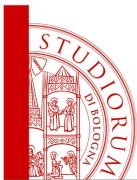




Trattamento SYN: Conclusioni Analisi di Popolazione

- ✦ Nessuna variazione significativa nella composizione del microbiota totale in seguito a trattamento
- ✦ Variazione significativa nella composizione del microbiota totale in rapporto al tempo
- ✦ *B. longum* PCB133 riscontrato in tutti gli animali trattati a T1 (>1%)
- ✦ Riduzione del numero e dell'intensità delle bande relative a *C. jejuni/C. coli*





**Grazie per
l'attenzione**