



IZSAM G. CAPOREALE  
TERAMO



*Campylobacter*

Laboratorio Nazionale di Riferimento

**Benessere animale e metagenomica delle popolazioni batteriche:  
risultati preliminari**

**Lisa Di Marcantonio**

**Teramo, 22 novembre 2018**

**Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione "Francesco Gramenzi"**



## Il *Campylobacter*

E' un patogeno di origine zoonosica che ha come serbatoio numerose specie animali, in particolare quelle aviarie

L'infezione da *Campylobacter* rappresenta una delle cause di tossinfezione più frequente

A livello europeo si colloca addirittura al primo posto quale causa di enterite infettiva

Il principale serbatoio è il tratto alimentare di un'ampia varietà di animali (pollame, suini, uccelli e cani)

Il *Campylobacter* è un componente della flora intestinale degli animali, la contaminazione avviene inevitabilmente al momento della macellazione e della eviscerazione



### Obiettivi del progetto

Ricerca di polli  
negativi al  
*Campylobacter*

Caratterizzazione  
del microbiota

Identificazione e  
selezione flora  
protettiva

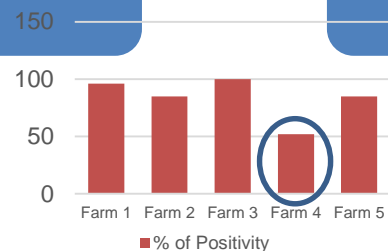


## Campionamento

Prevalenza  
*Campylobacter*

5 farms

Contenuto ciecale  
da carcasse



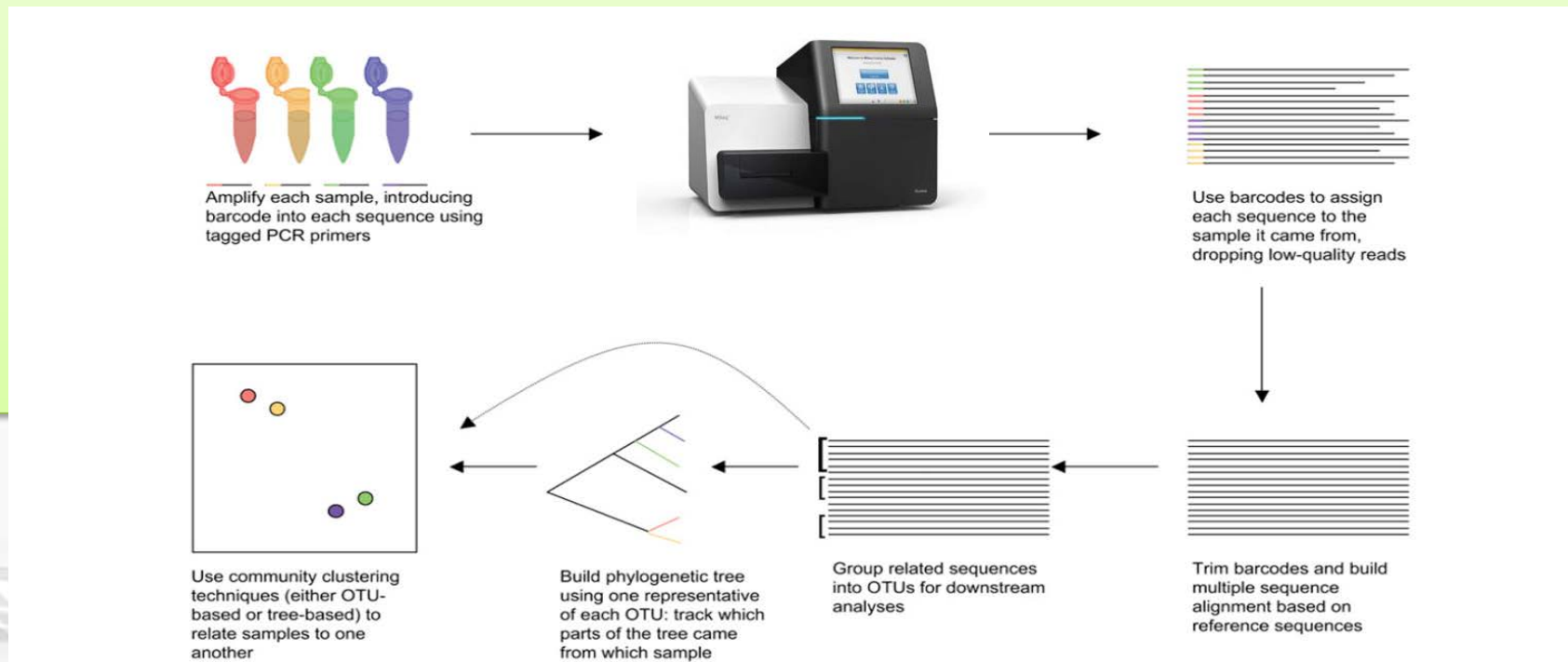
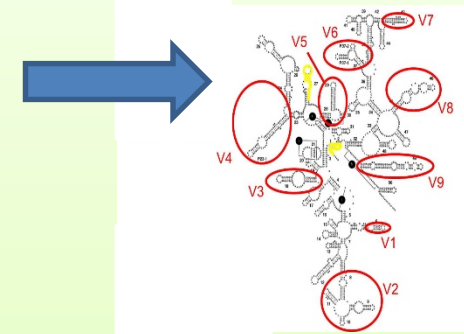
## Valutazione del benessere degli animali

Total Welfare Score = l'housing, nutrizione, salute e comportamento  
da 1 a 5

Farms analizzate					
Total Welfare score	Farm 1	Farm 2	Farm 3	Farm 4	Farm 5
5	1	3	2	4	

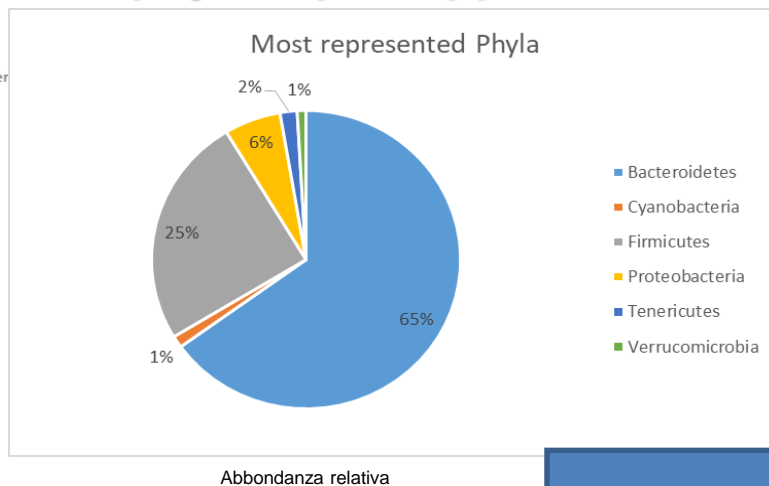
## Produzione dei dati NGS

- 91 Campioni: Divisi in 5 farms, in ciascuna farm erano presenti individui negativi and positivi al *Campylobacter*
- Amplificazione delle regioni variabili V3-V4 del 16S rRNA gene<sup>(1)</sup>
- Sequenziamento con la piattaforma NGS Illumina MiSeq300PE

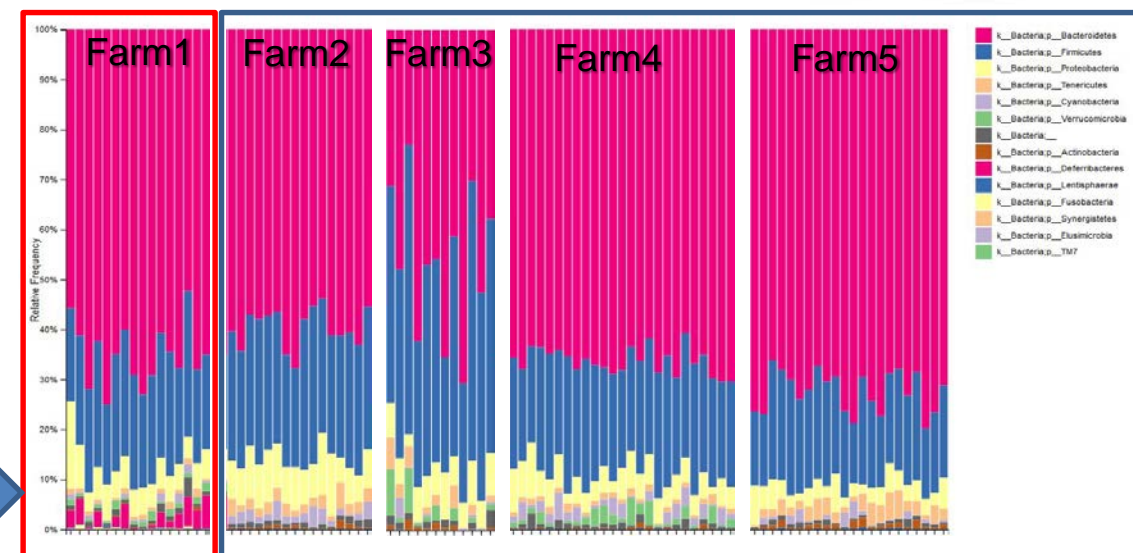


**\*OTU's sono usate per categorizzare i batteri in base alle similarità delle sequenze**

## I phylum più rappresentativi

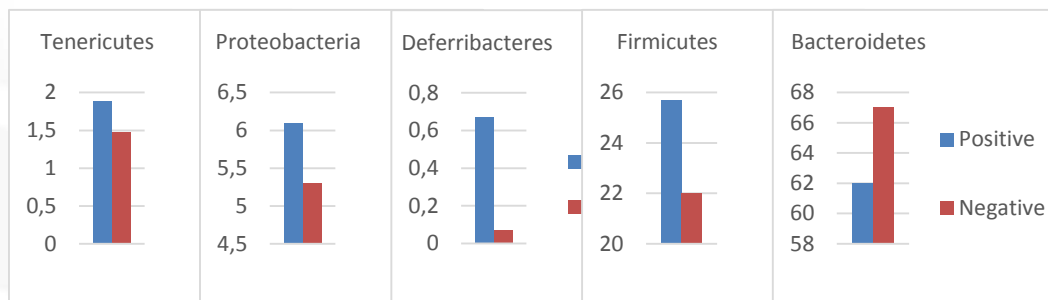


Max score

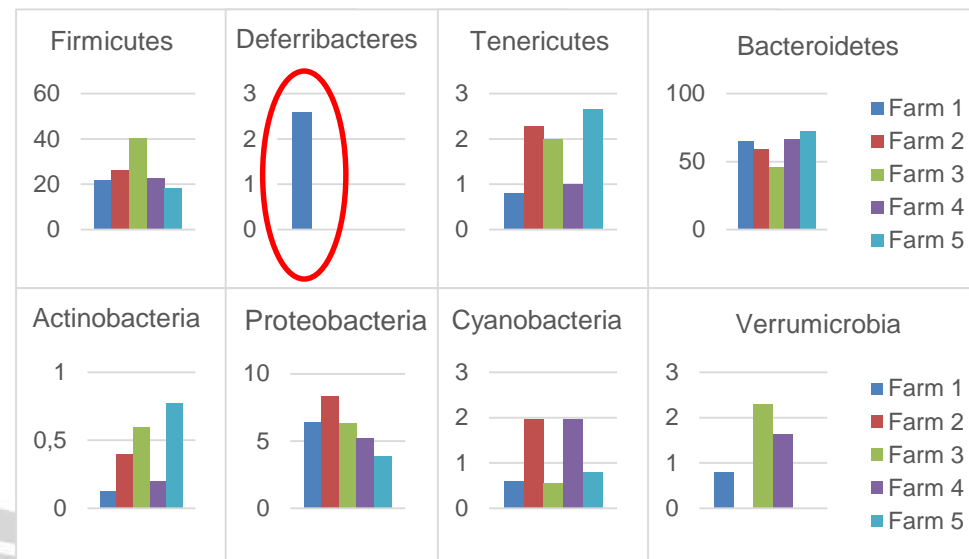


## Phylum più rappresentativi tra le diverse Farms

### Phylum più rappresentativi tra positivi e negativi



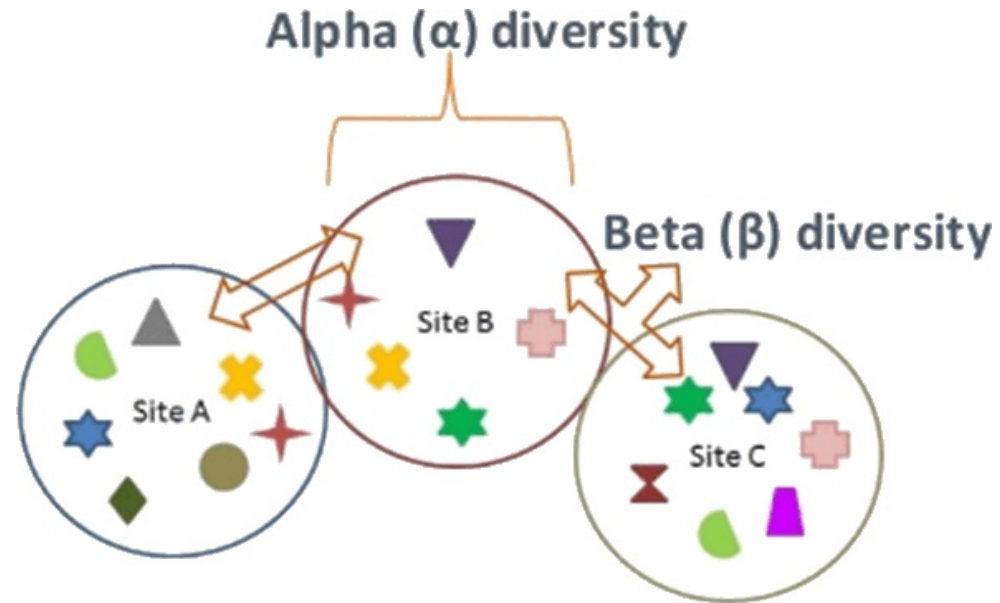
$P < 0,05$



$P < 0,05$



## Analisi dati NGS



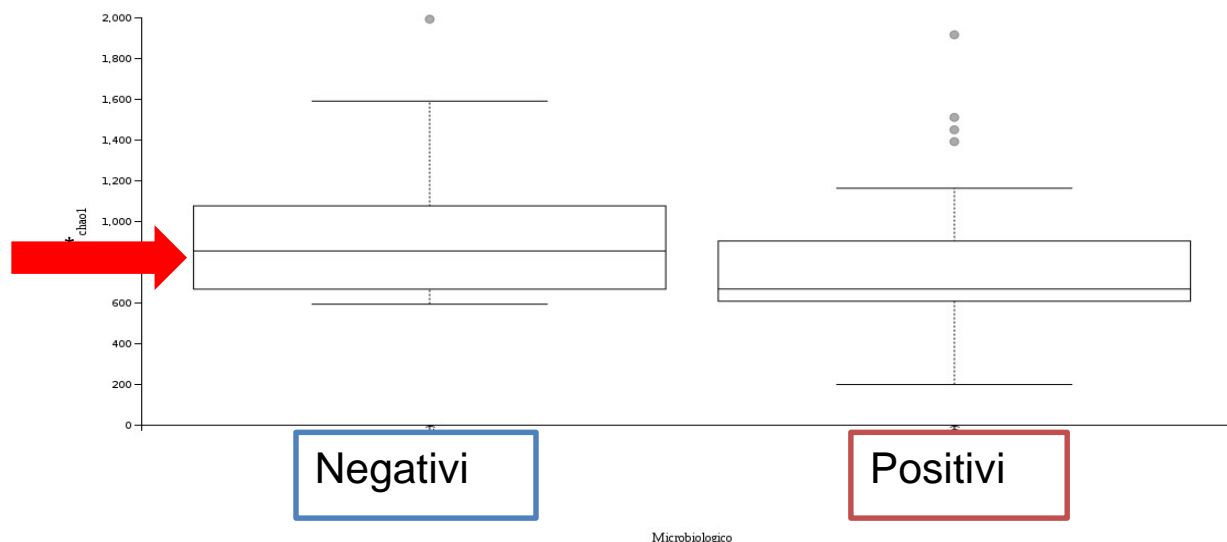
Alfa-Diversità=Rappresenta la diversità batterica presente in un determinato campione

Beta-Diversità=Rappresenta la dissimilarità batterica tra diversi campioni



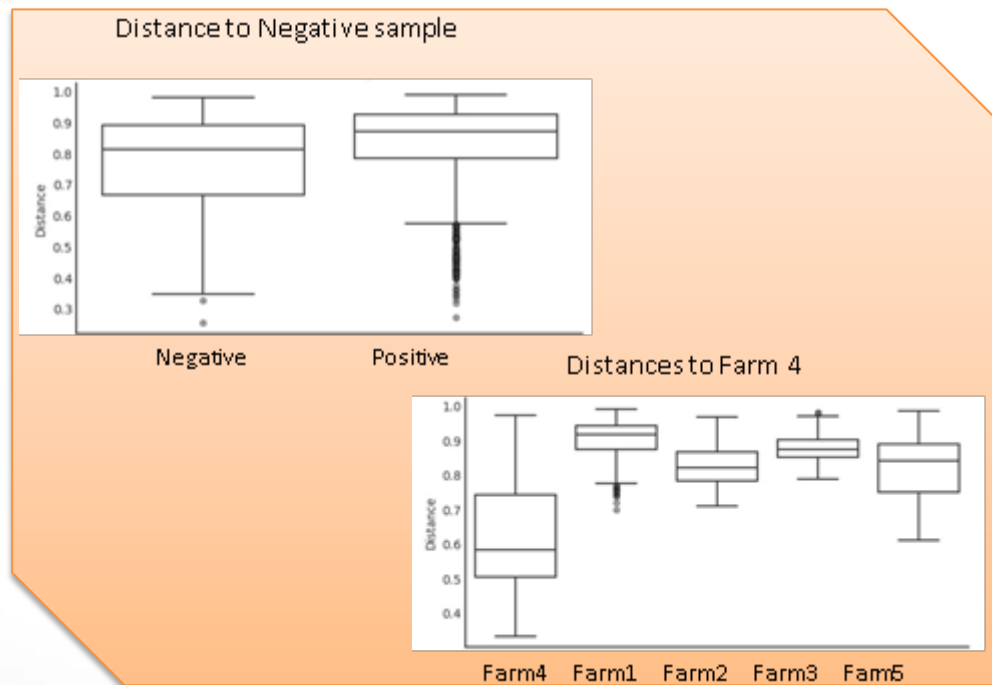
## Analisi dati NGS

### Alfa diversità tra campioni positivi e negativi al *Campylobacter*

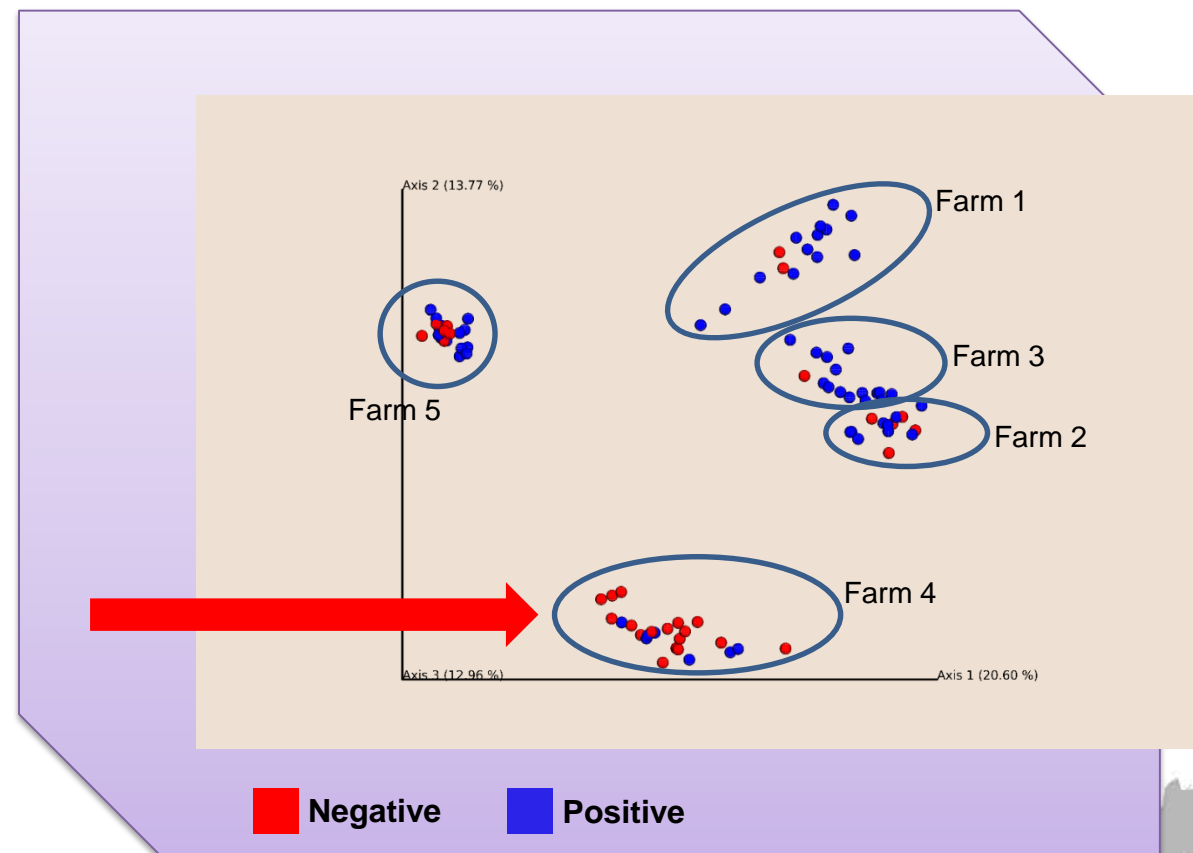


*L'analisi di Alfa-diversità con Chao1 è una misura della ricchezza di specie basata sulle OTUs per i campioni fecali dei campioni Negativi e Positivi alla presenza di Campylobacter. E' stata osservata una differenza significativa tra i due gruppi analizzati. ( $p < 0,05$ ).*

## Beta diversità



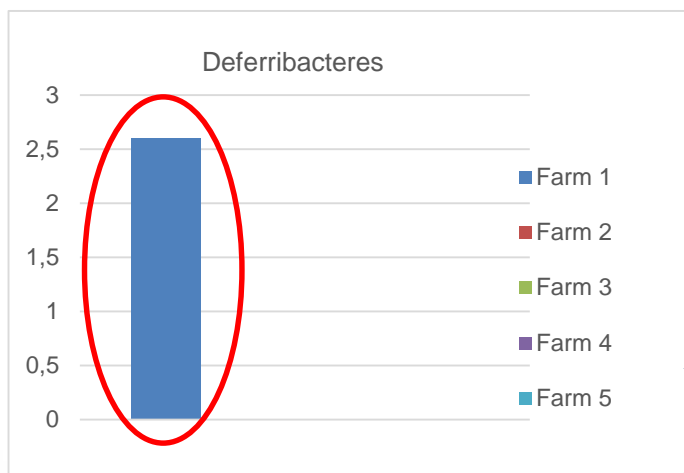
*Beta diversità (distanza unweighted-unifrac che da una misura qualitativa della dissomiglianza della comunità microbiche che tra le caratteristiche incorpora le relazioni filogenetiche) tra i diversi gruppi analizzati. ( $p < 0,05$ )*



*L'analisi Bray-Curtis distance è una misura quantitativa di dissimilarità di comunità batteriche. Three-dimensional plot based on principal coordinate analysis (PCoA).*

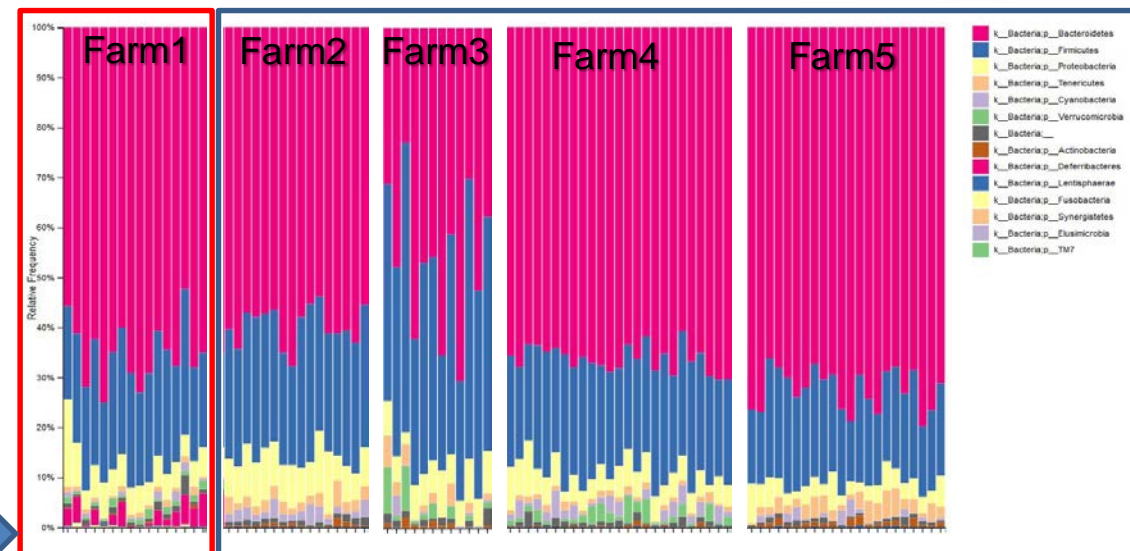


## Analisi dati NGS



$P < 0,05$

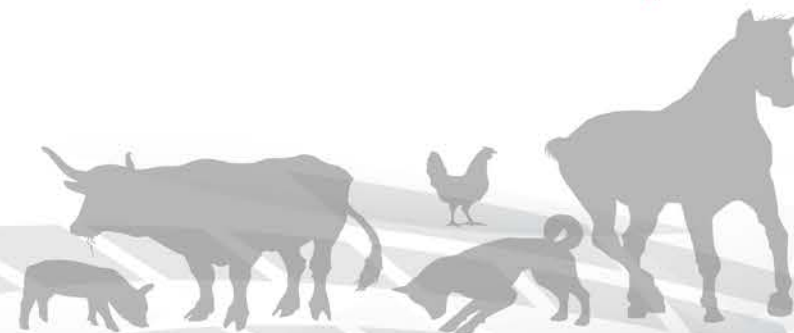
Max score



**Questo genere puo' essere riconducibile al benessere dei polli?**

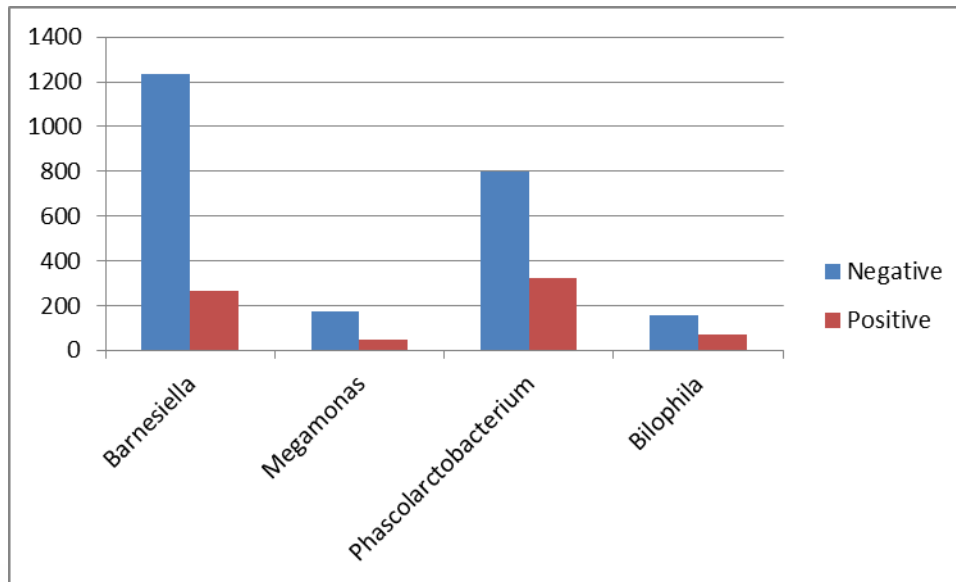


**Può essere un primo indicatore di benessere di questi animali?**

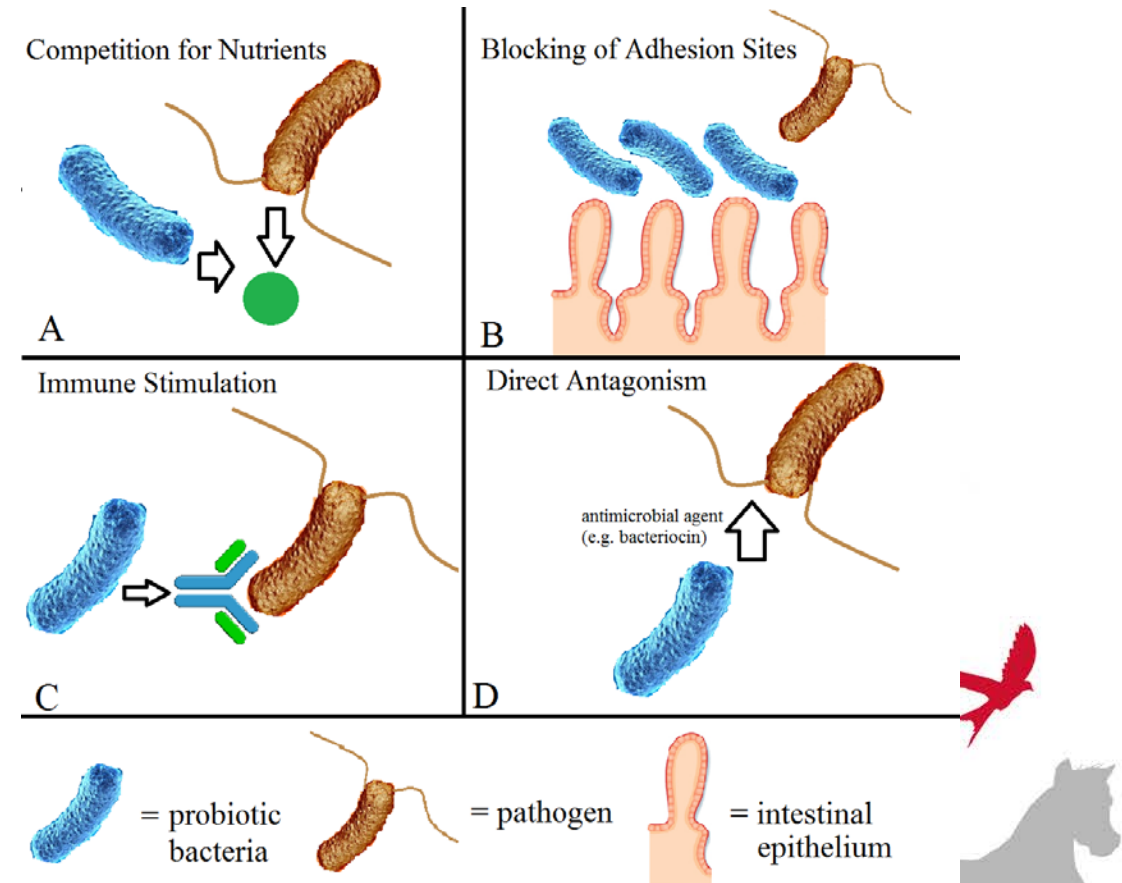


## Analisi dati NGS

**Generi più rappresentativi tra positivi e negativi**



$P < 0,05$



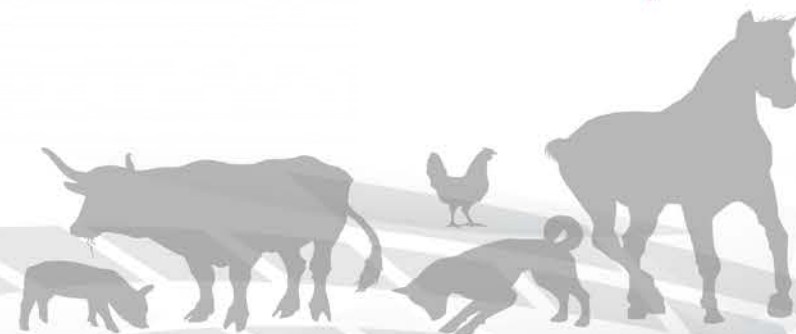
## Prospettive future

Le differenze significative della presenza batteri legati al genere *Barnesiella*, *Megamonas*, *Phascolarctobacterium*, *Biophila* nei campioni Negativi rispetto ai Positivi di Campylocater

La presenza del *Deferribacteres* suggeriscono nuove strategie nel campo della metagenomica e la loro caratterizzazione per meglio comprendere il loro ruolo nelle comunità microbiche.

**Characterization of *Phascolarctobacterium succinatutens* sp. nov., an Asaccharolytic, Succinate-Utilizing Bacterium Isolated from Human Feces**» Yohei Watanabe, Fumiko Nagai, Masami Morotomi  
*Microbial Ecology* DOI: 10.1128/AEM.06035-11

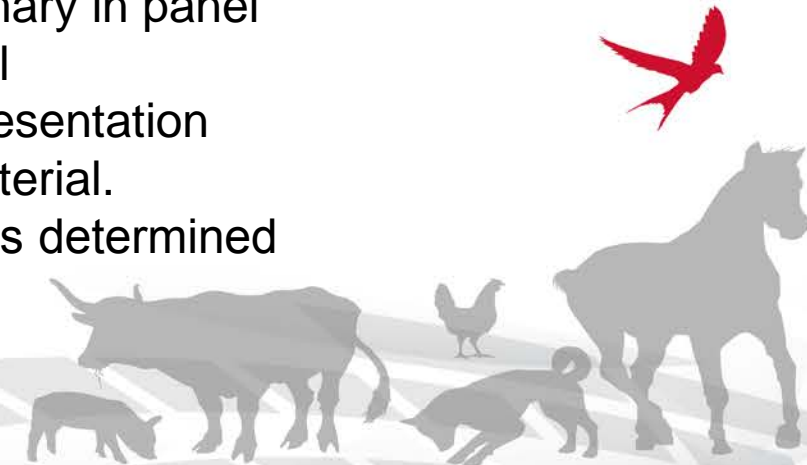
**"*Barnesiella viscericola* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Porphyromonadaceae isolated from chicken caecum".** \*Sakamoto, M.; Lan, P. T. N.; Benno, Y. (1 February 2007). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **57** (2): 342–346.





## Alpha diversity

Taxonomy summary and microbial diversity of OTUs from fecal samples DNA extracted from fecal samples was used for 16S rRNA PCR amplification, sequenced, and clustered into OTUs. The taxonomy summary (A), principal coordinate analysis (B), and Shannon diversity index (C) were analyzed using QIIME software to determine differences in microbial community structures. The sequences from at least 15 animals per treatment are shown in each analysis. The taxonomy summary in panel A represents OTUs with greater than 1% total representation; OTUs with less than 1% representation are listed in Table S4 in the supplemental material. Statistical difference ( $P \leq 0.05$ ) in panel C was determined by PERMANOVA.





# Time table

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Kick-off the meeting	■																							
WP1-Research and selection of subjects resistant to campylobacteriosis	■	■	■	■																				
WP2-Development of sequence protocols for 16s amplicons via NGS platform		■	■	■	■																			
WP2-Metagenomic protocol development of for cecal content		■	■	■	■																			
WP2-Evaluation of an enrichment or depletion system of eukaryotic DNA		■	■	■	■																			
WP3-16s amplicon sequence on subjects resistant to campylobacteriosis					■	■	■	■	■	■	■	■	■											
WP3-NGS sequence with a metagenomic protocol on samples resistant to campylobacteriosis						■	■	■	■	■	■	■	■	■										
WP3-Metagenomic association study										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
WP3-Search for bioinformatics analysis tools	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■													
WP3-In vitro evaluation of isolates with potential competitive or protective action																■	■	■	■	■	■	■	■	
Disclosure of data																						■	■	■

▲ ACHIEVED

▲ ACHIEVED

▲ ACHIEVED

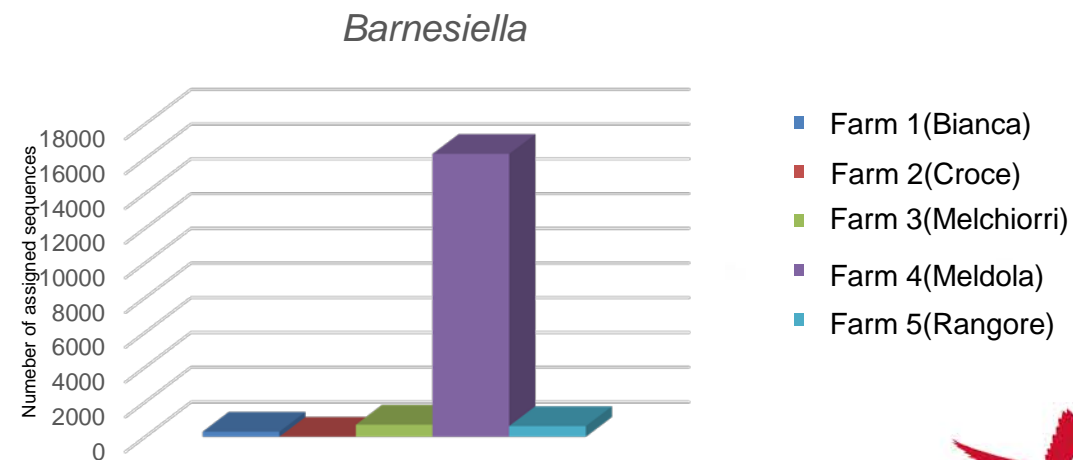
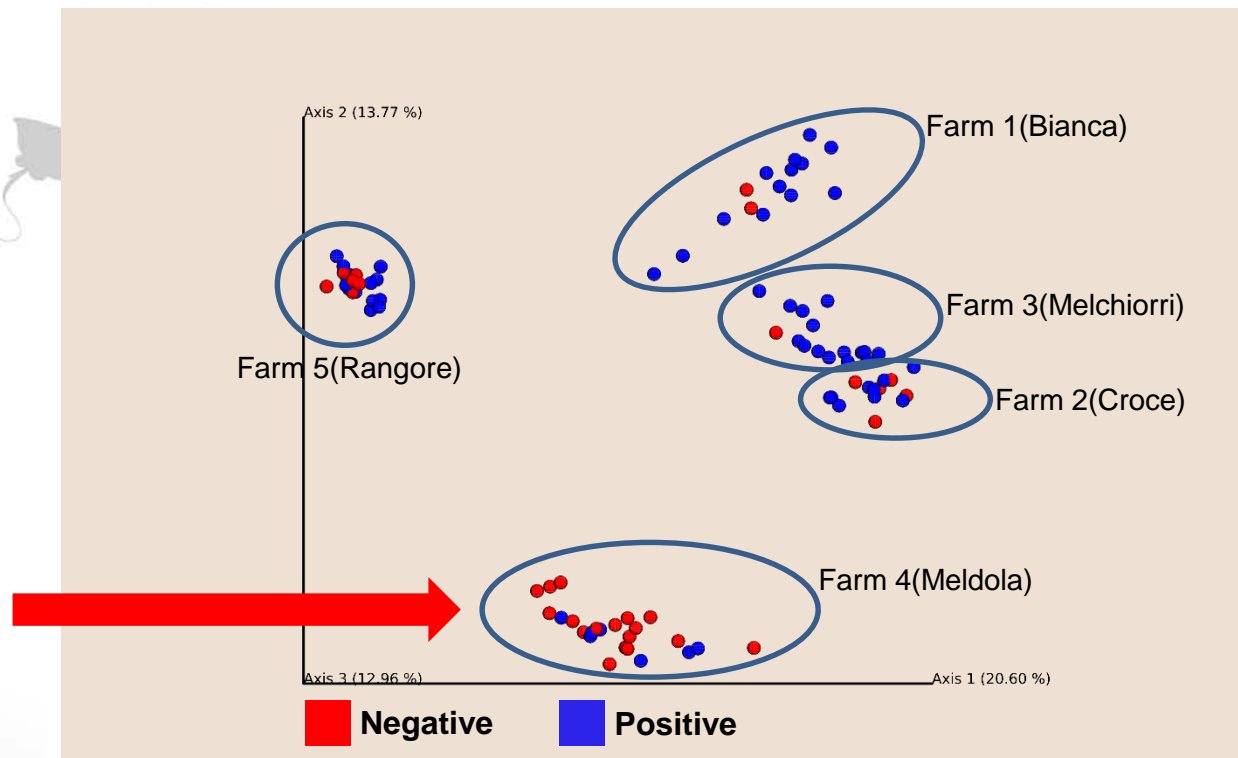
▲ ACHIEVED

▲ ACHIEVED

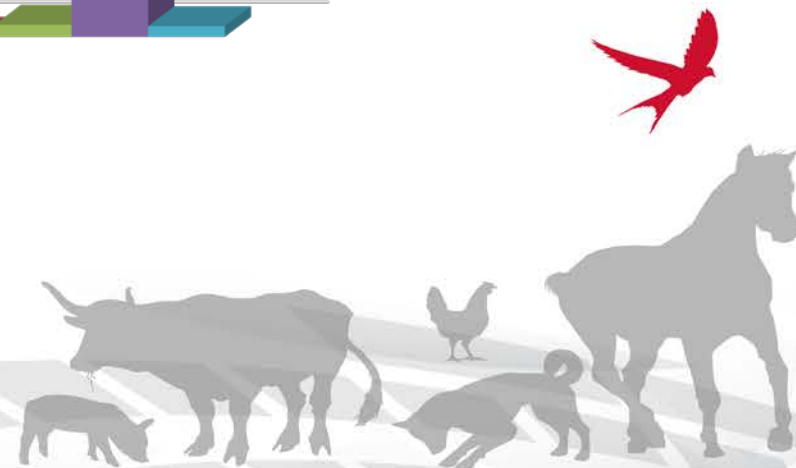
▲ ACHIEVED

▲ ACHIEVED

## Beta diversity



Intestinal Microbiota Containing *Barnesiella* Species Cures Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Colonization  
Infect Immun. Carles Ubeda et al., 2013 Mar; 81(3): 965–973.



# pipeline

La corsa di sequenziamento viene processata con il tool di Illumina bcl2fstq versione 2 per estrarre i raw file fastq e fare il demultiplexing. Abbiamo sequenziato con MiSeq in 300PE. Il frammento di 16S che viene sequenziato Ã piÃ¹ corto delle 600 basi sequenziate per cui le code dei due mate che rappresentano il centro del frammento si sovrappongono. Graficamente si puÃ² rappresentare come:

- Per imuovere i primier sul 5' delle reads abbiamo usato cutadapt versione 1.14
- Per rimuovere gli adattatori al 3' abbiamo usato scythe versione 0.991
- Per rimuovere le code delle reads a bassa qualitÃ abbiamo usato sickle versione 1.33

Dopo aver filtrato, possiamo fare il passaggio di assemblaggio dei mate. Lo scopo Ã ottenere un file fasta con i frammenti di 16S. Per fare questo passaggio usiamo **pandaseq** con parametri abbastanza restrittivi per assicurarci di assemblare solo le coppie di reads piÃ¹ affidabili.

```
pandaseq -f trimmed1.fastq.gz -r trimmed2.fastq.gz -U unaligned.txt -w pandaseq.fasta -o 50 -t 0.9 -T 30
```

Il file fasta ottenuto non ha i nomi delle sequenze compatiibili con qiime1, per cui processiamo i file fasta dei campioni. Uso questa riga di comando per ogni sample ;

```
cat pandaseq.fasta | sed "s/>/>nome.sample /" | perl -lne 'if (m/^>/{ $i++; s/ /_$/ } print' > nome.sample.fasta
```

I fasta file di tutti i campioni vengono concatenati per ottenere il il dataset di partenza.

## Identificare OTU closed reference

Per creare la tabella biom di partenza di Qiime occorre avere il fasta concatenato con tutte le sequenze 16S ed il database di greengenes di qiime. La posizione sul filesystem del database greengenes dipende dall'installazione di qiime.

```
nohup pick_closed_reference_otus.py -i all.fsta -o closed -r gg_otus-13_8-release/rep_set/97_otus.fasta -t gg_otus-13_8-release/taxonomy/97_otu_taxonomy.txt -a -O 4
```

Dopo aver creato la matrice biom Ã possibile produrre i sommari dei taxa identificati ed occorre usare il map file

```
summarize_taxa.py -m map.txt -i otu_table.biom -o taxa_summary_table -L 8 -t make_otu_heatmap_html.py -i otu_table.biom -o OTU_Heatmap summarize_taxa_through_plots.py -i otu_table.biom -o taxa_summary -m map.txt
```

Per calcolare l' **alpha-diversity** ci sono due possibili test:

```
alpha_diversity.py -i otu_table.biom -m chao1 -o adiv_chao1.txt
```

```
alpha_diversity.py -i otu_table.biom -m PD_whole_tree -o adiv_pd.txt -t 97_otus.tree
```

Per fare l'analisi delle componenti principali occorre prima calcolare la **beta-diversity**.

```
beta_diversity.py -i otu_table.biom -m euclidean -o beta_div
```

**beta\_div**Ã una directory ed al suo interno verrÃ creato il file **euclidean\_otu\_table.txt**.

Ora possiamo fare l'analisi delle componenti principali:

```
principal_coordinates.py -i euclidean_otu_table.txt -o beta_div_coords.txt
```

Per avere i relativi grafici:

```
make_2d_plots.py -i beta_div_coords.txt -m map.txt -o res
```

**res** Ã la directory con i risultati richiesti.

## Comparazione dei gruppi

La comparzione tra i gruppi Ã stata effettuata utilizzando lo script **group\_significance** contenuto nella pipeline qiime il quale permette di confrontate le frequenze degli OTU nei campioni in esame e evidenziare la presenza o meno di differenze statisticamente significative tra i gruppi nell'abbondanza degli OTU. Il test statistico utilizzato di default Ã il *Kruskal-Wallis*.

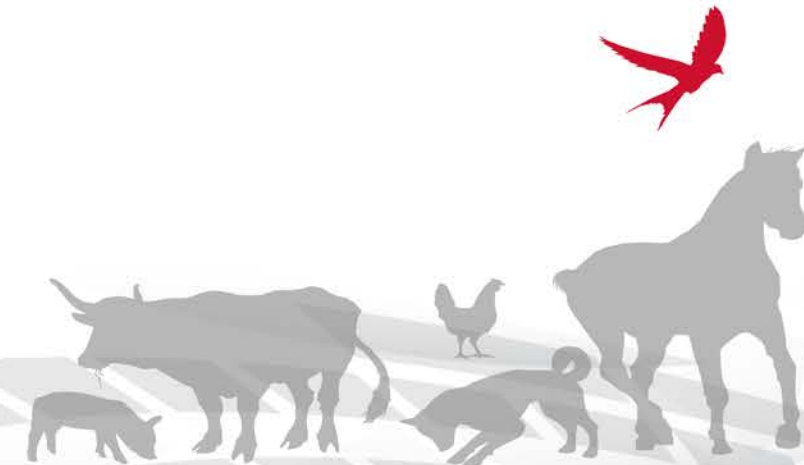
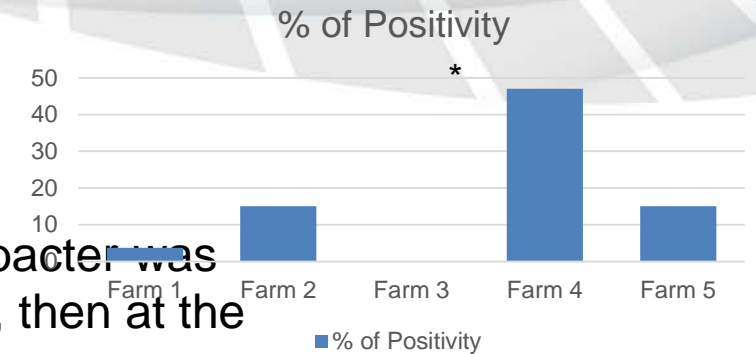
```
group_significance.py -i otu_table.biom -m map_mod_IJZSAM_vGG.txt -c comparazione4 -s kruskal_wallis -o comparazione4.out
```

Il comando prende come input un map file creato ad hoc, la tabella biom ed il nome della colonna che specifica la comparazione che vogliamo fare

## Campionamento

For each sampling session, the first positive test of the lot at Campylobacter was carried out through a 30-day screening (cloacal swabs on 15 animals), then at the time of slaughter:

- to evaluate the level of animal welfare of the lot under examination with the modified Welfare Quality protocol (assessments in breeding and slaughterhouse)?
- take cloacal swabs on 40 animals before transport and 40 animals on arrival in slaughterhouse (Research Campylobacter, Listeria monocytogenes, Salmonella)?
- withdraw the caecal contents (tonsils ciecali) of 40 carcasses after evisceration (Research and Numbering Campylobacter, Listeria monocytogenes, Salmonella)?
- take samples of skin from 40 carcasses post-cooling tunnel (Campylobacter Research and Numbering, Listeria monocytogenes, Salmonella)





# Analysis of the NGS data

- Abundance, number and taxonomic classification of OTUs
- Diversity analysis (alpha / beta-diversity) in the microbial community

