IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Caratterizzazione del microbiota del pollo e impatto sul *Campylobacter*

Lisa Di Marcantonio, PhD
Unità di Zootecnia

Teramo, 3 luglio 2019

COSE' IL MICROBIOTA

- Un microbiota include tutti i microrganismi in un particolare ecosistema.
- Microbioma è usato per descrivere il totale del materiale genetico dei microrganismi in un particolare ecosistema.

Obiettivi del progetto

- Ricerca di polli negativi al Campylobacter
- Caratterizzazione del microbiota
- Identificazione e selezione flora protettiva

PERCHE' STUDIARE IL MICROBIOTA

Perché ad oggi è stato studiato il *Campylobacter* ma manca un studio nella popolazione di polli negativi, e la composizione del loro microbiota cercando di capire perchè la loro flora li protegge dalla presenza del *Campylobacter*.

INFATTI

Raggiunta l'età di macellazione il 60% dei polli risultano positivi al *Campylobacter**, ma il resto grazie forse ad una particolare composizione della microbiota rimane negativo *Campylobacter*

* S.J. Evans*, A.R. Sayers A longitudinal study of campylobacter infection of broiler flocks in Great Britain. Epidemiology Department, Veterinary Laboratories Agency, Weybridge, New Haw,Addlestone, Surrey KT15 3NB, UK
29 November 1999; accepted 7 April 2000

Campylobacter

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

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)

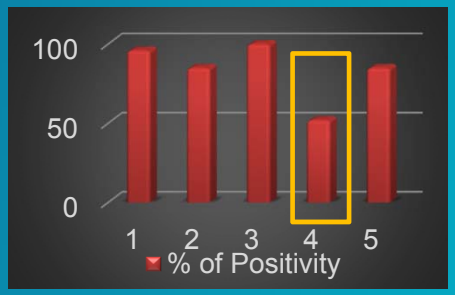
- Il *Campylobacter* è un componente della flora intestinale dei polli
- La contaminazione avviene inevitabilmente al momento della macellazione e della

CAMPIONAMENTO

5 Farms

Prevalenza Campylobacter

Contenuto ciecale da carcasse



VALUTAZIONE BENESSERE ANIMALE

Total Welfare Score = l'housing, nutrizione, salute e comportamento da 1 a 5
Usando protocollo "Welfare Quality" (variabile da 0 a 400)

Total Welfare score

Farms	1	2	3	4	5
Score	5	1	3	2	4

Produzione dei dati NGS

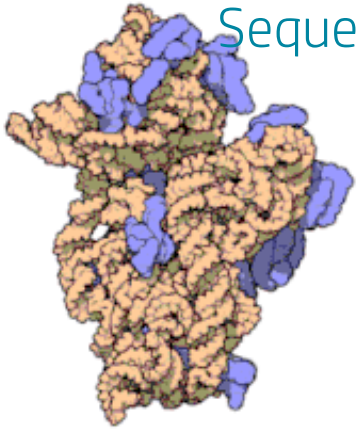
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

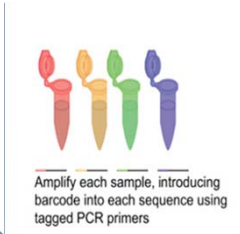
Campylobacter Laboratorio Nazionale di Riferimento

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

Sequenziamento con la piattaforma NGS Illumina MiSeq300PE





IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

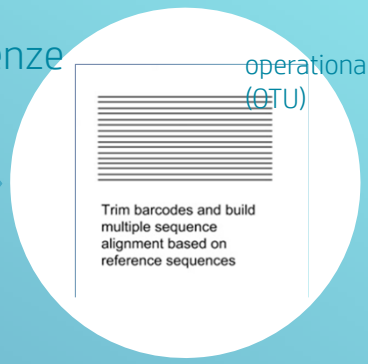
Quantitative Insights Into Microbial Ecology

qiime

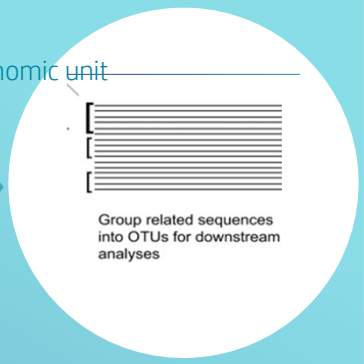
NGS data analysis

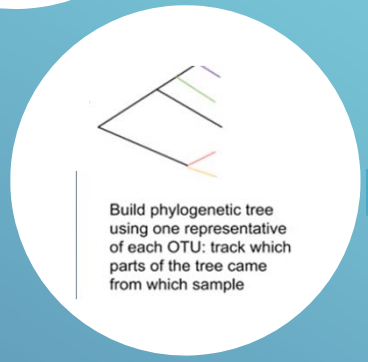
Tool bioinformatico che analizza l'intera pipeline

Sequenze



operational taxonomic unit (OTU)

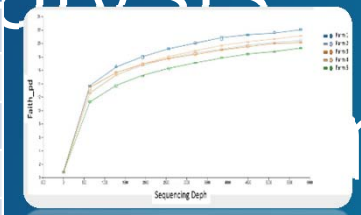




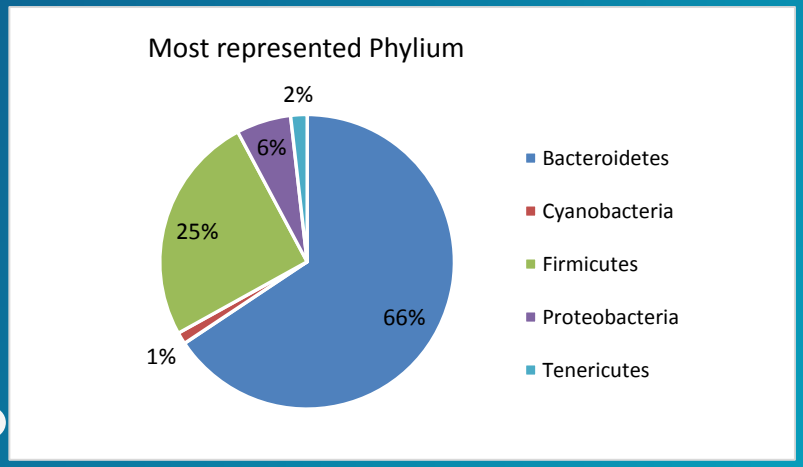
Regno
Phylium
Classe
Ordine
Famiglia
Genere
Specie

NGS data analysis

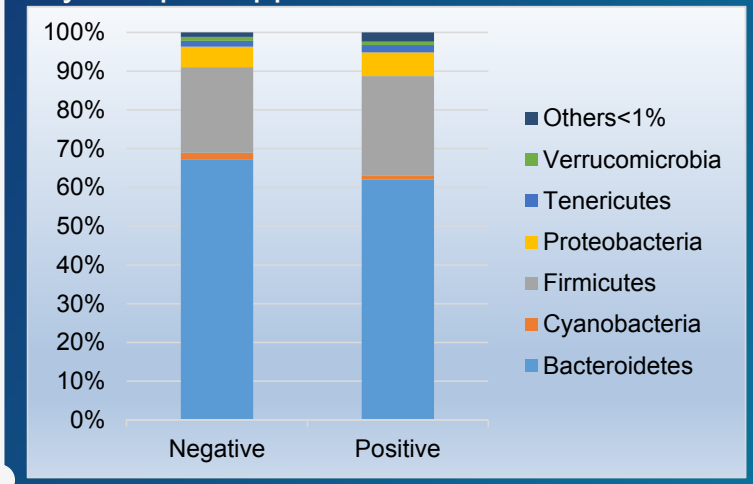
Dataset	Reads	Total samples	Sampling depth	Samples retained
Farm 1	2451610	16	5780	16
Farm 2	5219523	16	5780	16
Farm 3	2989165	12	5780	12
Farm 4	7574159	25	5780	25
Farm 5	10124275	22	5780	22
Total	28358732	91		91



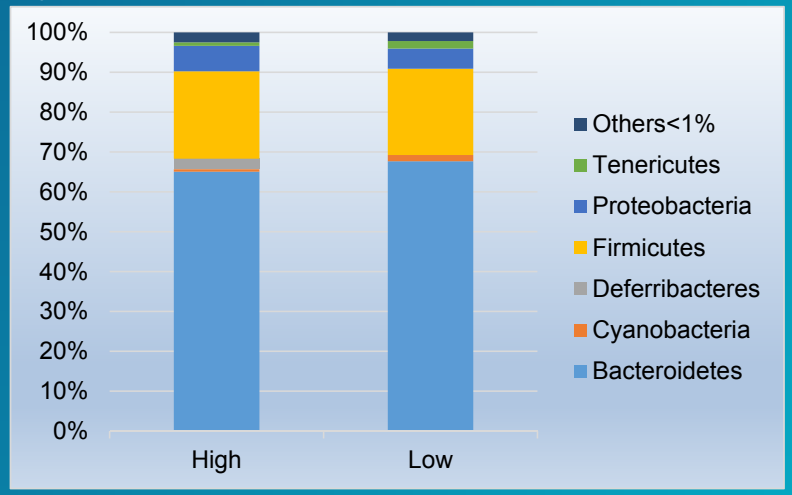
Phylum più rappresentativi



Phylum più rappresentativi – POSITIVI VS NEGATIVI



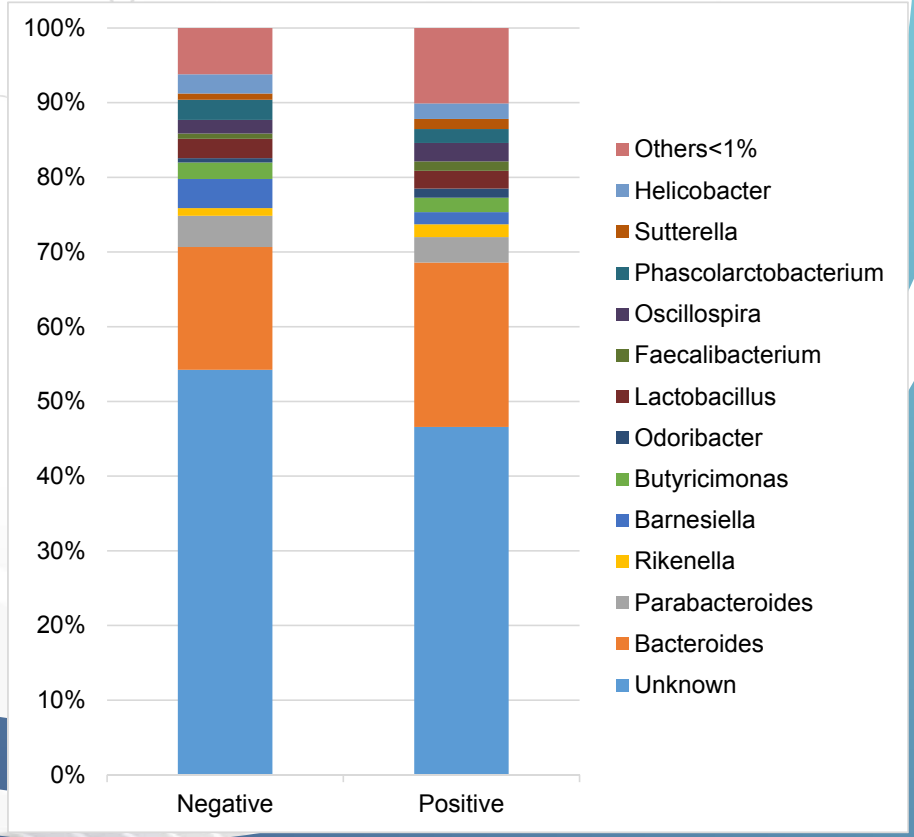
Phylum più rappresentativi - BENESSERE



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

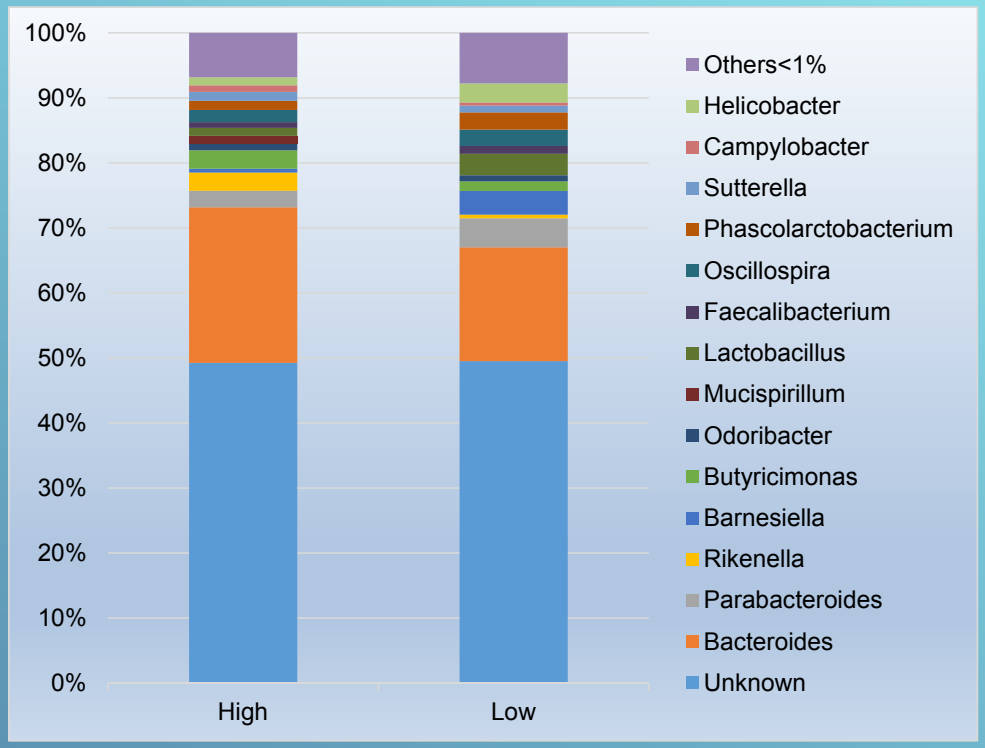
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

NGS data analysis generi



Generi più rappresentativi tra campioni positivi e negativi

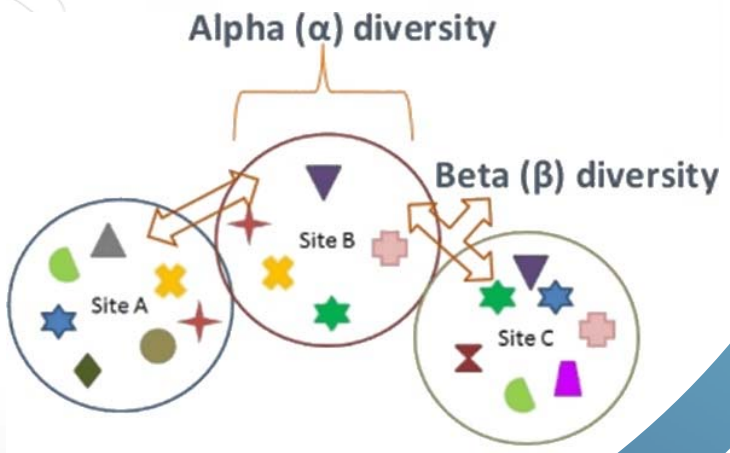
Generi più presenti nei gruppi che considerano il livello di benessere



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

NGS data analysis

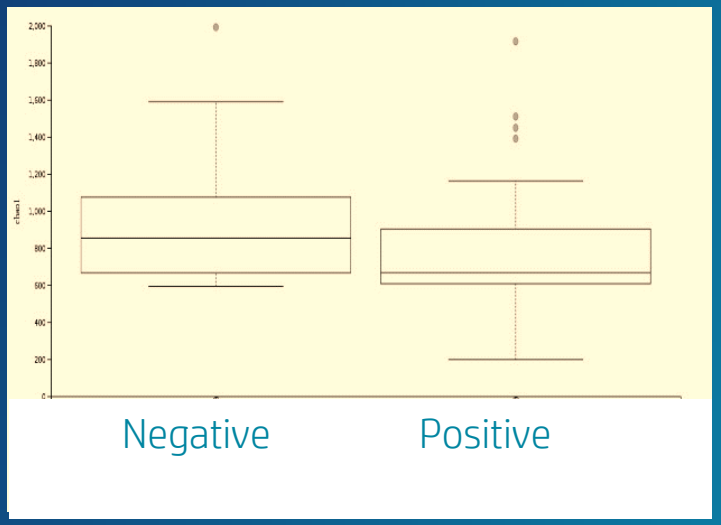


Alfa-Diversità=Rappresenta la diversità batterica presente in un determinato campione

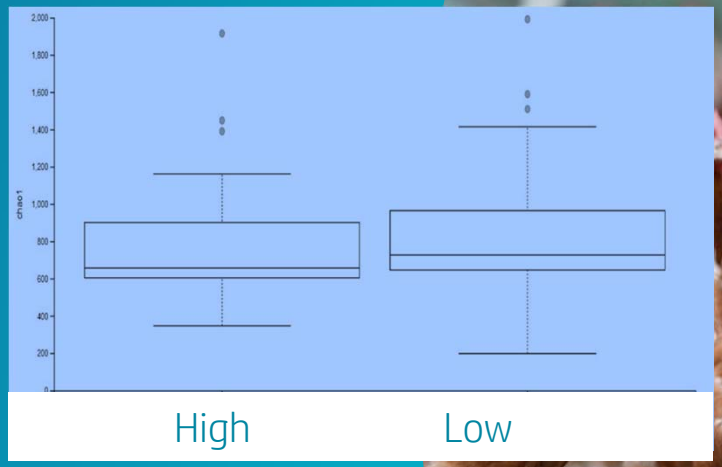
Beta-Diversità=Rappresenta la dissimilarità batterica tra diversi campioni

NGS data analysis

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-VALUE 0.012

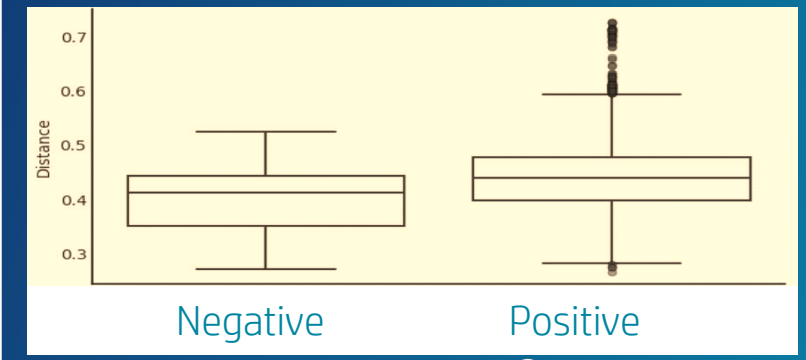


Nei campioni fecali dei polli a Basso ed Alto livello di benessere non è' stata osservata una differenza significativa tra i due gruppi analizzati. P-VALUE 0.243

NGS data analysis

Beta diversità tra campioni positivi e negativi al *Campylobacter*

Distanza Bray Curtis (misura quantitative della dissimilarità di una cumunità)



Dissimilarità batterica tra campioni positivi e negativi

P-VALUE 0.002

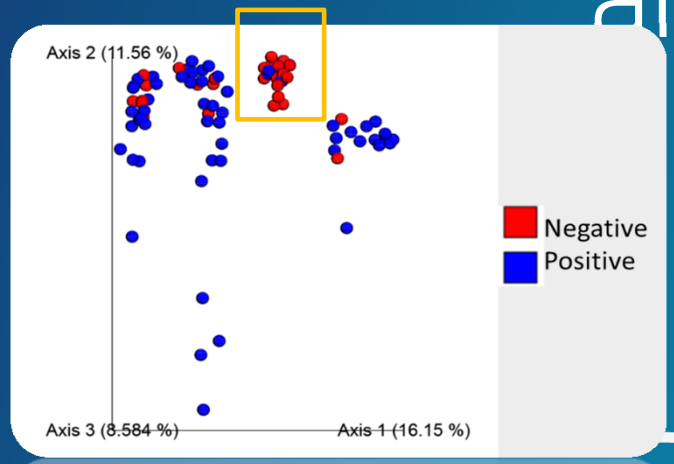
Dissimilarità batterica tra campioni a basso e alto livello di benessere

P-VALUE 0.001

NGS data analysis

Beta diversità tra campioni positivi e negativi al *Campylobacter*

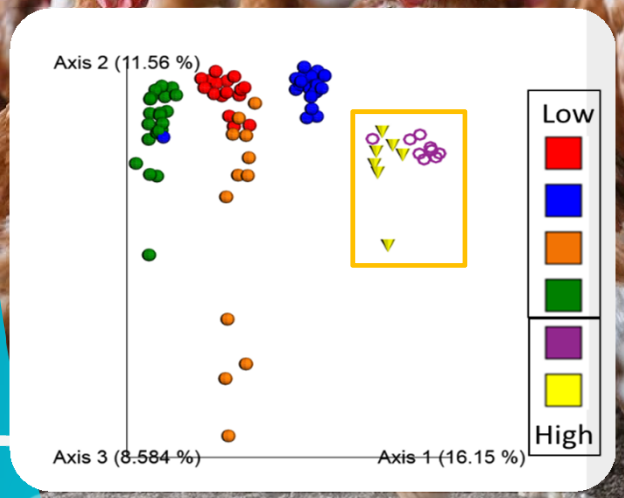
Plot PCoA basato sulla distanza unweighted UniFrac



Bray-Curtis distance (a quantitative measure of community dissimilarity)

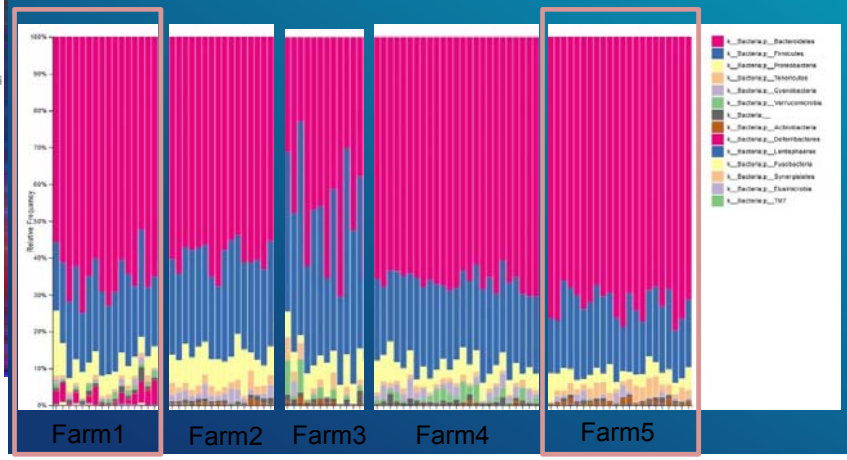
Dissimilarità batterica tra campioni positivi e negativi

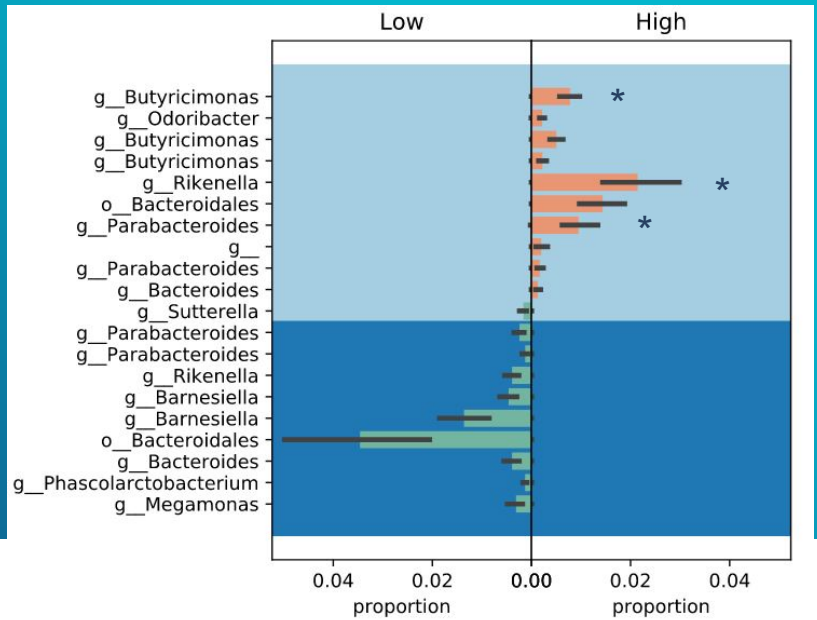
Dissimilarità batterica tra campioni con basso e alto livello di benessere



NGS data analysis

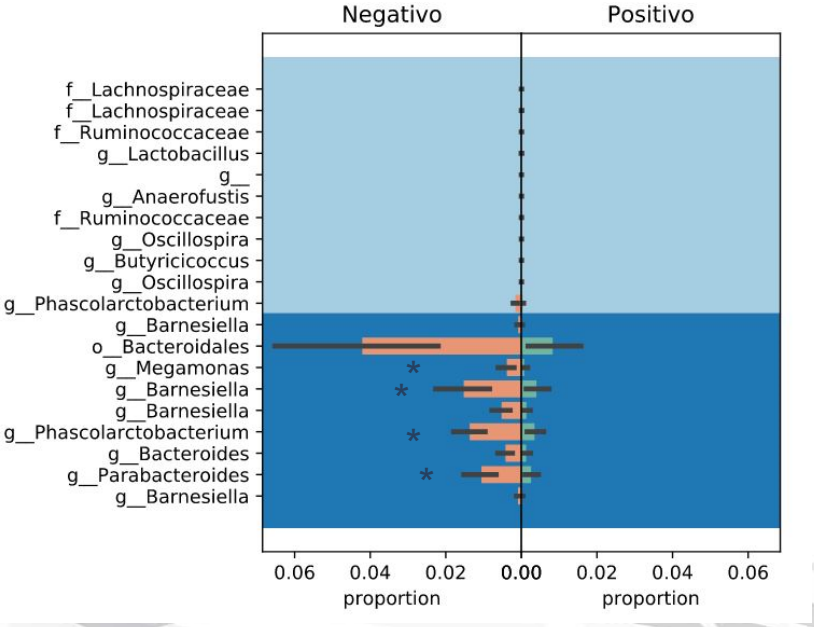
Composizione differenziale a livello del genere batterico





Campioni Positivi e Negativi

I campioni negativi e positivi hanno mostrato un diversa composizione batterica (genere) al Campylobacter. Negativi: < Barnesiella, Phascolarctobacterium, Parabacteroides, Megamonas.



Campioni con diverso livello di benessere

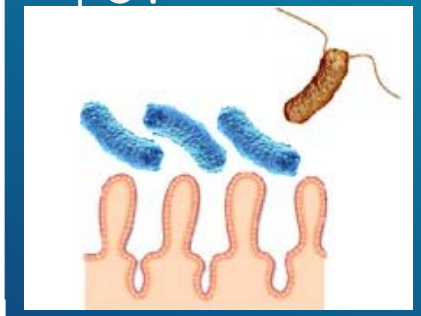
I campioni con livelli di benessere alti e bassi hanno mostrato un diversa composizione batterica (genere) al Campylobacter. Benessere basso: < Barnesiella. Benessere alto: < Rikella, Parabacteroides, Butyricimonas

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

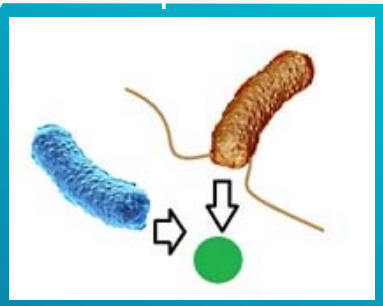
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Possibili ipotesi

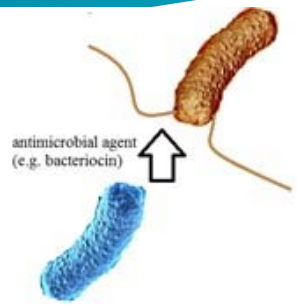
Competizione per I siti di



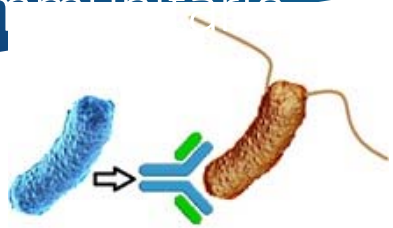
Competizione per i nutrienti

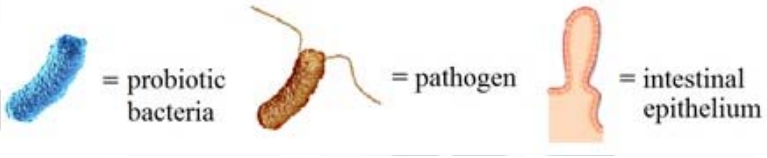


Competizione di



Stimolazione del Sistema Immunitario





Prospettive future

Selezione flora protettiva

- <*Barnesiella*: eliminate and protect against the intestinal dominance of antibiotic-resistant pathogenic bacteria. The abundance of Barnesiella correlates with the amount of several immunoregulatory cells.
- high diversity levels have been reported to help resistance against invading pathogens.

Campioni Negativi al *Campylobacter*
< *Barnesiella, Megamonas, Phascolarctobacterium, Biophila* suggeriscono strategie di studio *in vitro* e *in vivo*: caratterizzazione e conoscenza dei meccanismi di esclusione del *Campylobacter*

Possibili biosensori

- <Butyricimonas: butyrate producers, anti-inflammatory properties, reduces inflammation, helps maintain a healthy gut.
- >Butyricimonas in the gut may play an inflammation-based role in the pathogenesis of depression, increased proinflammatory gene expression

Benessere Animale
<*Rikella, Parabacteroides e Butyricimonas*, potrebbero essere considerati come biosensori del benessere dei polli in allevamento

Possibili attrati

Metagenomica dei virus e dei funghi

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.*

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Rife