IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

CombAcT Campylobacter: caratterizzazione del microbiota di pollo per selezionare la flora protettiva. Risultati preliminari

Lisa Di Marcantonio, PhD
Unità di Batteriologia
Teramo, 13 giugno 2019

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

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

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

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 eviscerazione

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

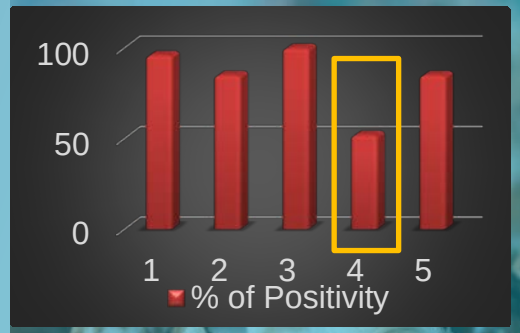
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

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

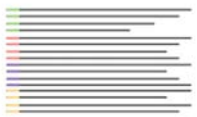
qiime

Analysis data NGS

Tool bioinformatico che analizza l'intera pipeline

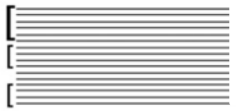
Sequenze

operational taxonomic unit (OTU)

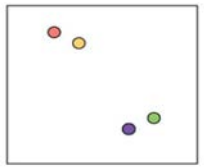


Use barcodes to assign each sequence to the sample it came from, dropping low-quality reads

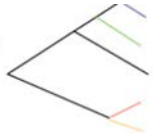
Trim barcodes and build multiple sequence alignment based on reference sequences



Group related sequences into OTUs for downstream analyses



Use community clustering techniques (either OTU-based or tree-based) to relate samples to one another



Build phylogenetic tree using one representative of each OTU: track which parts of the tree came from which sample

Regno

Phylium

Classe

Ordine

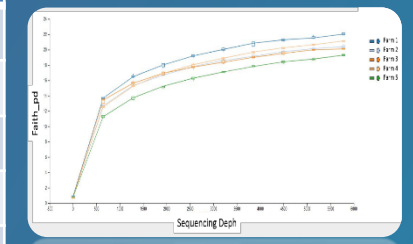
Famiglia

Genere

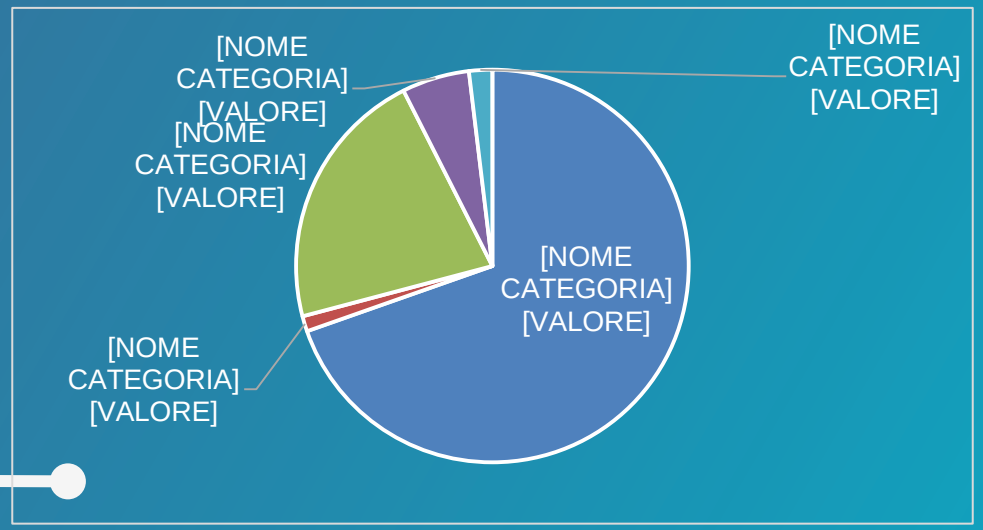
Specie

NGS data analysis
Phylum

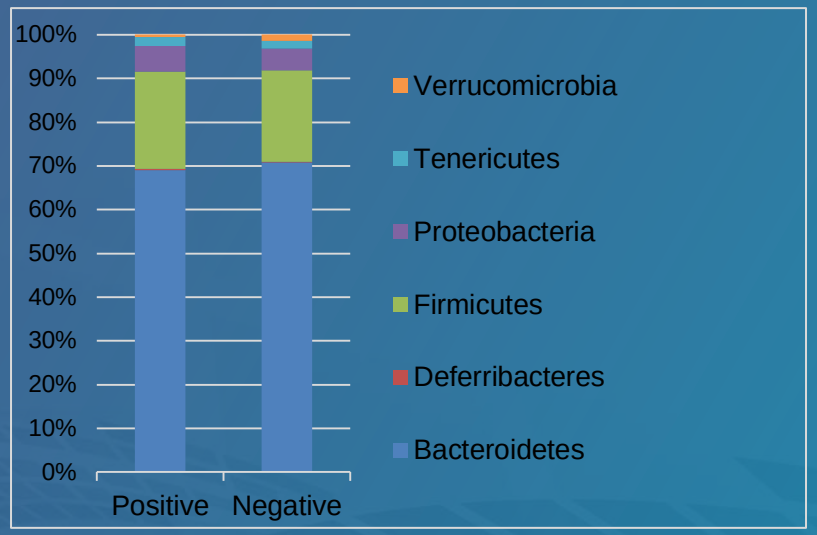
Dataset	Reads	Total samples	Sampling depth	Samples retained
Farm 1	2451610	16	5780	16
Farm 2	5219523	16	5780	16
Farm 3	2989165	12	5780	12
Farm 4	7574159	25	5780	25
Farm 5	10124275	22	5780	22
Total	28358732	91		91



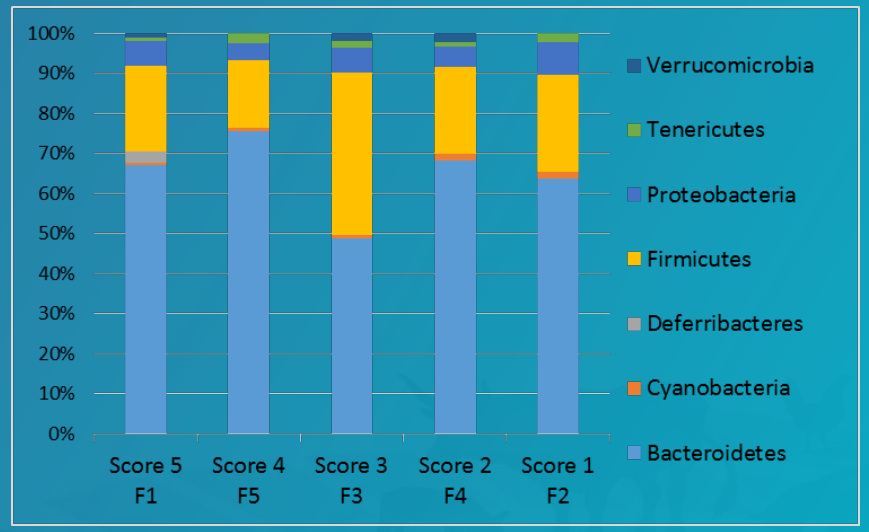
Phylum più rappresentativi



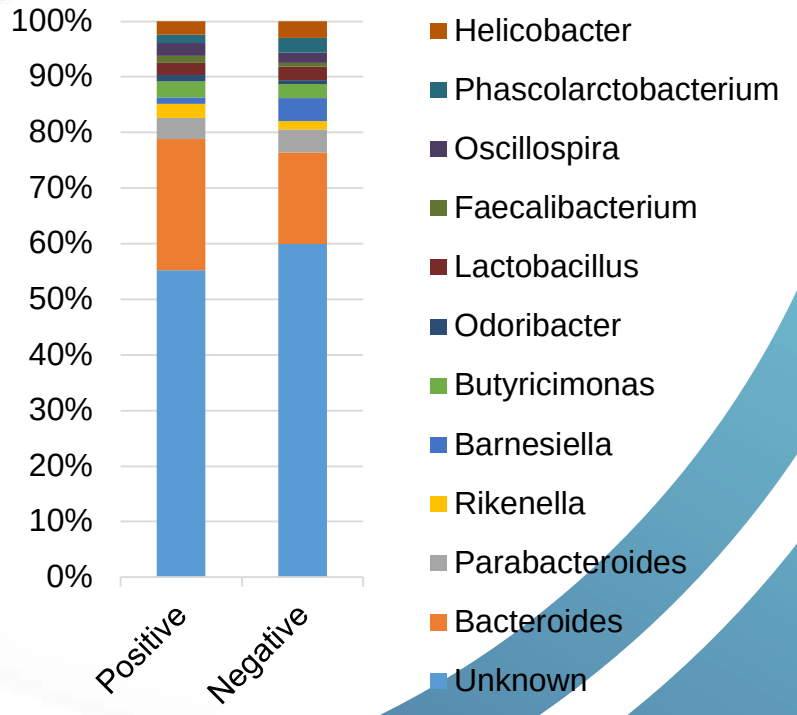
Phylium più rappresentativi – POSITIVI VS NEGATIVI



Phylium più rappresentativi - BENESSERE

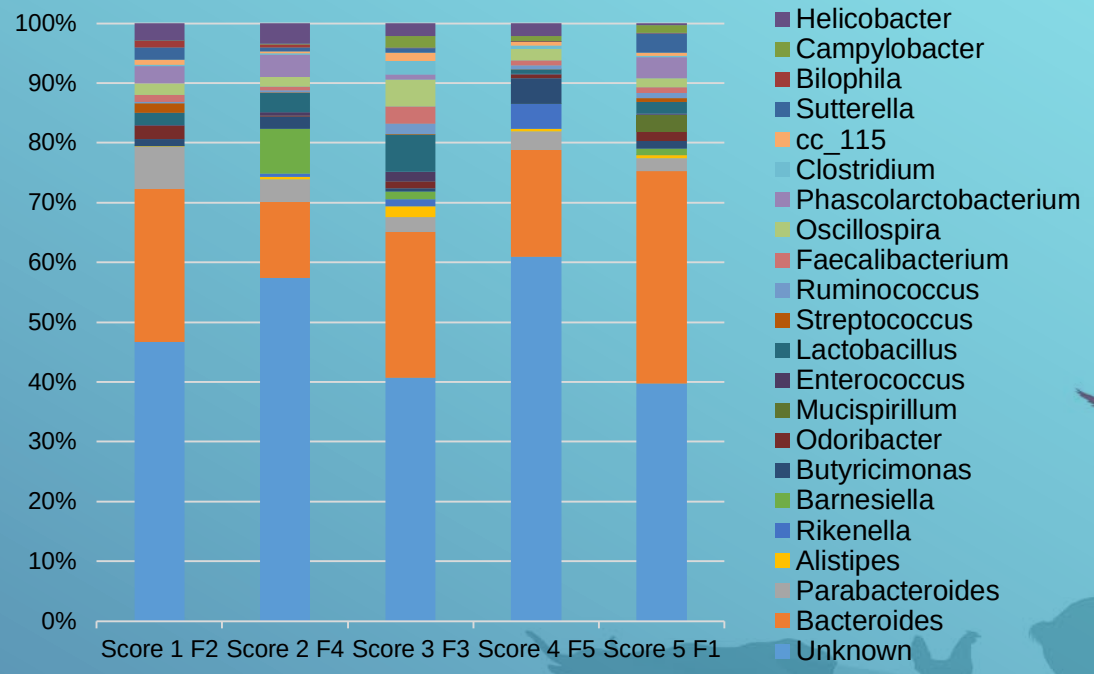


NGS data analysis
Generi



Generi più rappresentativi tra campioni positivi e negativi

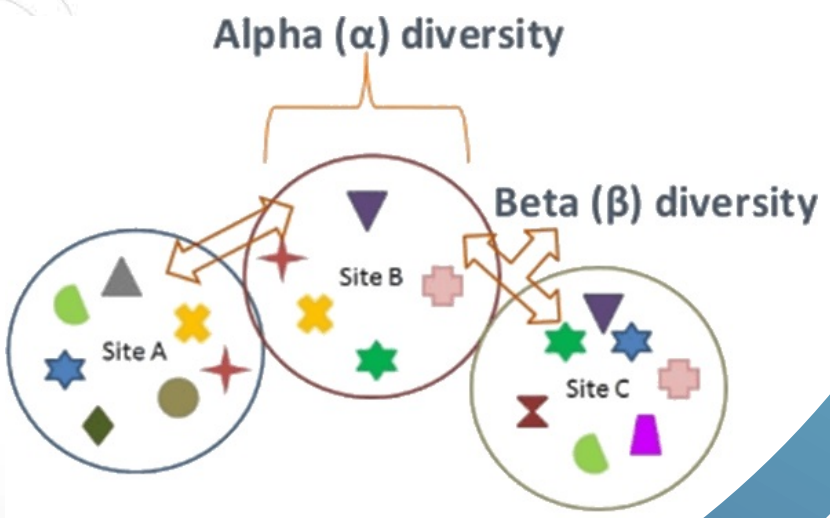
Generi più presenti nei gruppi che considerano il livello di benessere



IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

NGS data analysis



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

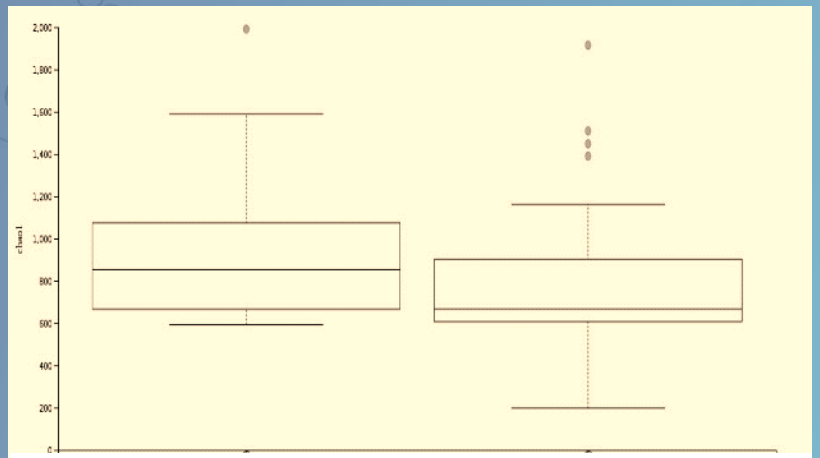
Beta-Diversità=Rappresenta la dissimilarità batterica tra diversi campioni

NGS data analysis

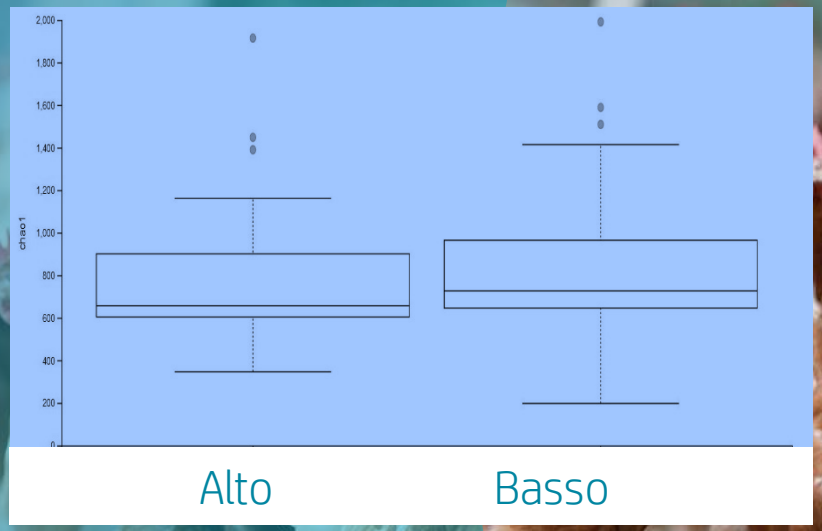
IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Alfa diversità tra campioni positivi/negativi e benessere



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

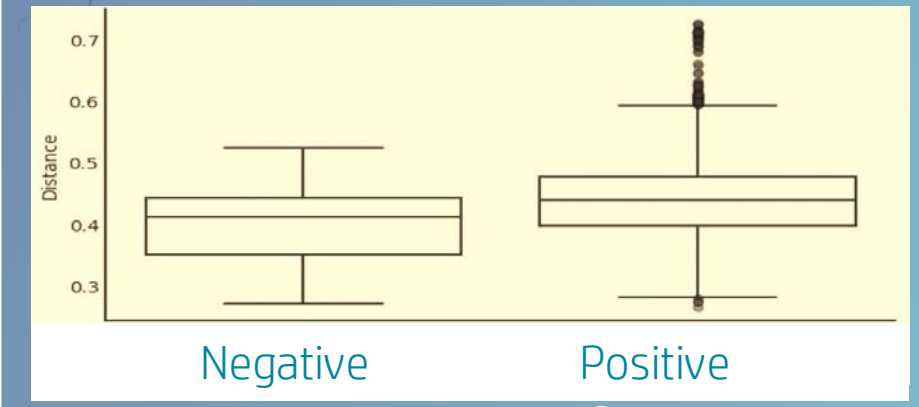


Nei campioni fecali dei polli a Basso ed Alto livello di benessere non è' stata osservata una differenza significativa tra i due gruppi analizzati. P-VALUE 0.243

NGS data analysis

Beta diversità tra campioni positivi/negativi e benessere

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



Dissimilarità batterica tra campioni
positivi e negativi

P-VALUE 0.002

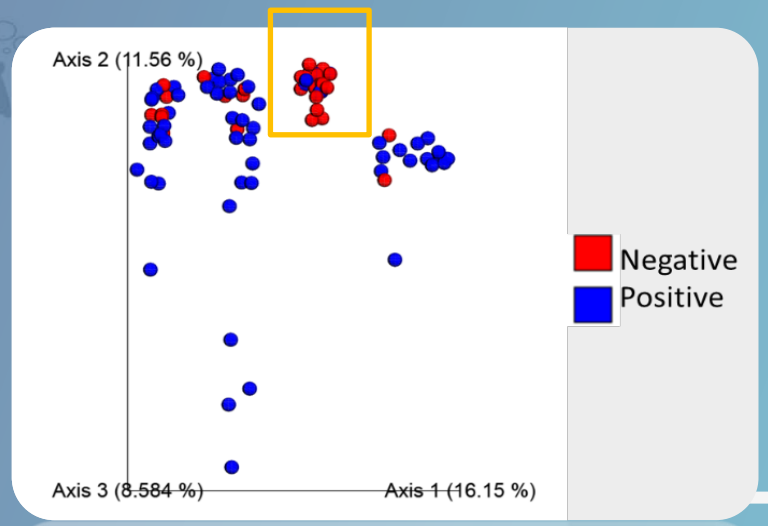
Dissimilarità batterica tra campioni a
basso e alto livello di benessere

P-VALUE 0.001

NGS data analysis

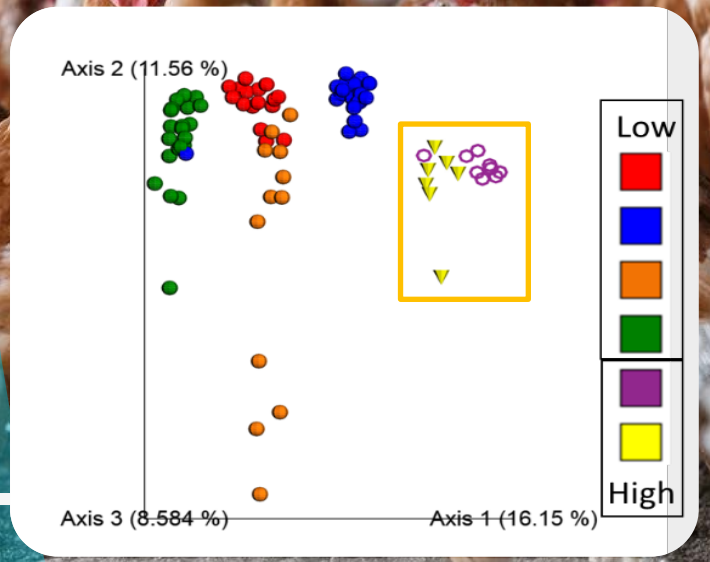
Beta diversità tra campioni positivi/negativi al *Campylobacter e benessere*

Plot PCoA basato sulla distanza unweighted UniFrac



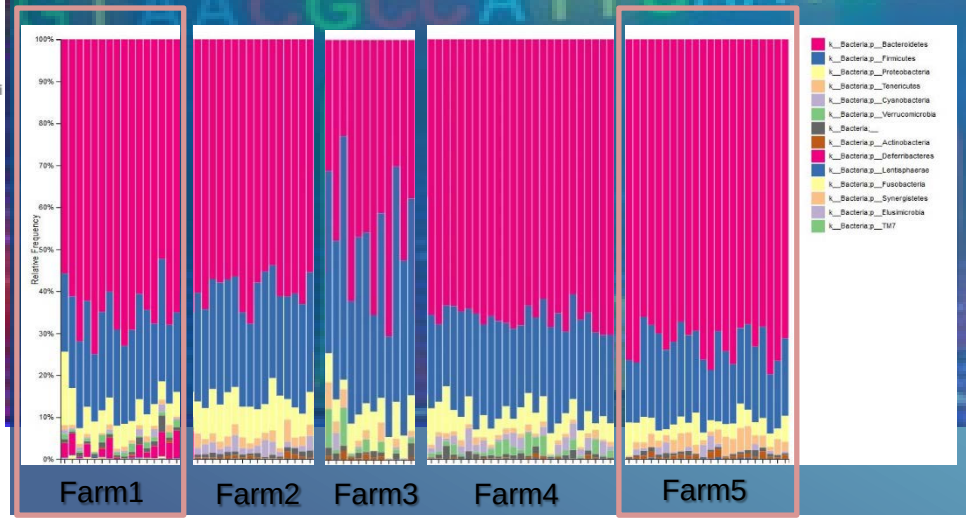
Dissimilarità batterica tra campioni positivi e negativi

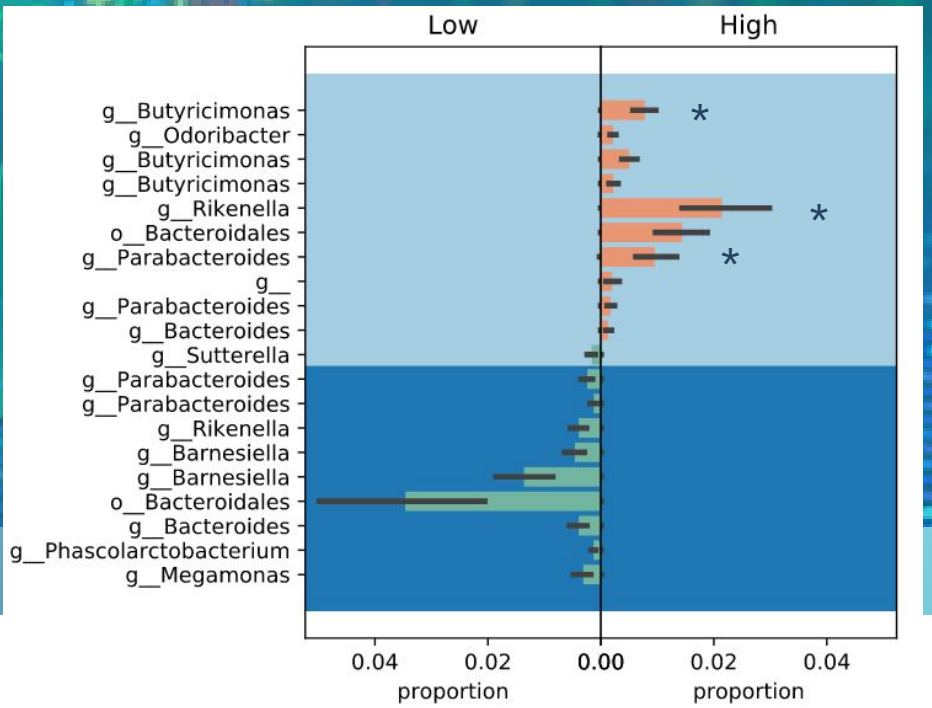
Dissimilarità batterica tra campioni con basso e alto livello di benessere



NGS data analysis

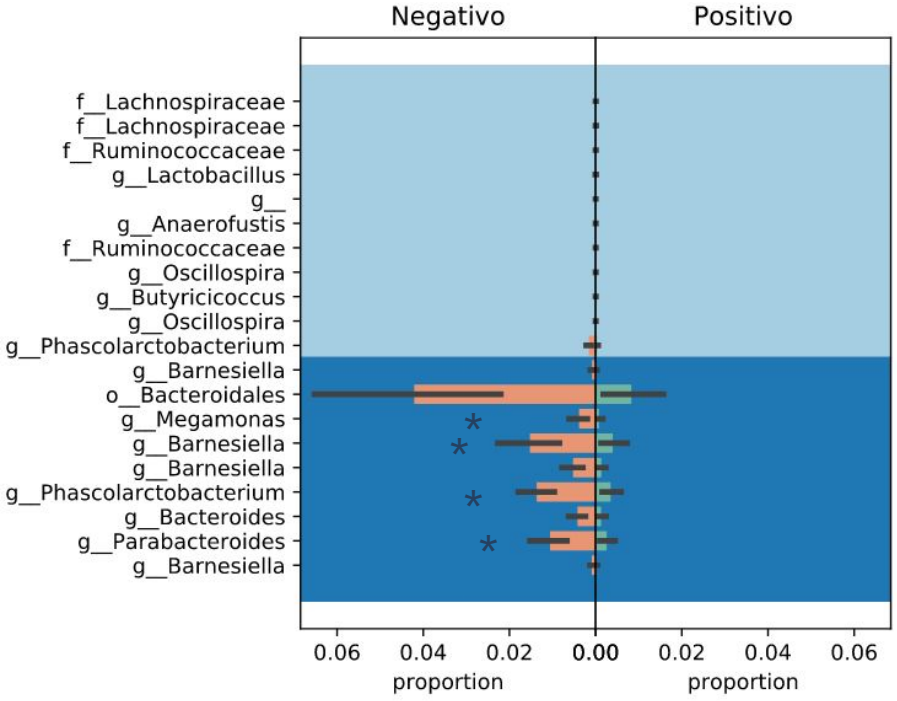
Composizione differenziale a livello del genere batterico





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

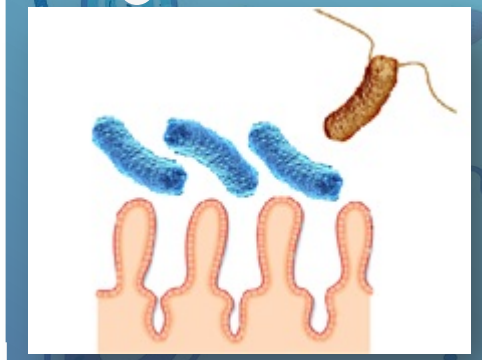
I campioni con livelli di benessere alti e bassi hanno mostrato un diversa composizione batterica (genere) al Campylobacter. Benessere basso: < Barnesiella. Benessere alto: < Rikella, Parabacteroides, Butyricimonas

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

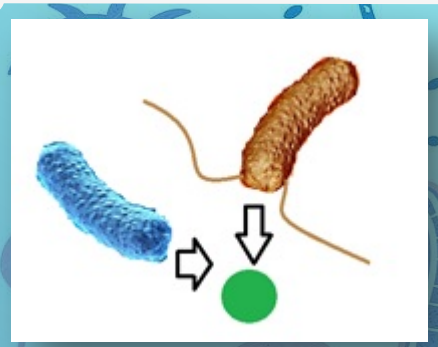
Campylobacter
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Possibili ipotesi

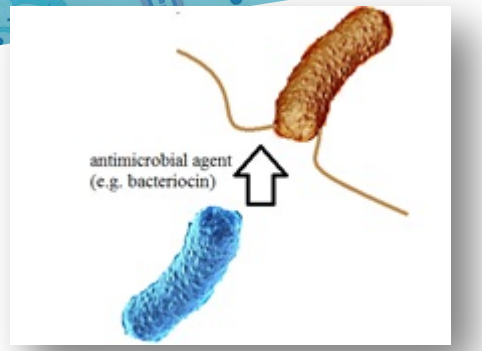
Competizione per I siti di adesione



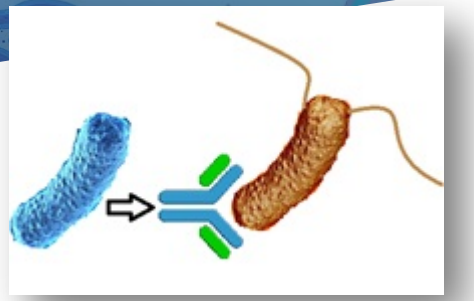
Competizione per i nutrienti

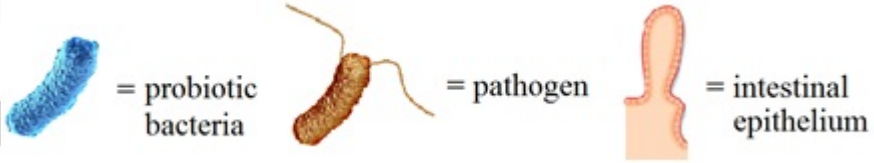


Competizione diretta



Stimolazione del Sistema Immunitario





Prospettive future

Selezione flora protettiva

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

Possibili biosensori

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

Possibili altri attori

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