

RIDUZIONE DELL'ABBONDANZA RELATIVA DI *HELICOBACTER PULLORUM* NEL MICROBIOTA CECALE DI POLLI ALLEVATI CON SISTEMA FREE-RANGE

Borrelli L.^{1,3}, Varriale L.¹, Coretti L.^{2,3}, Pace A.¹, Russo T.P.¹, Santaniello A.¹, Gavazzi L.⁴, Lembo F.^{2,3}, Fioretti A.¹, Dipineto L.^{1,3}

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università di Napoli Federico II, Via F. Delpino 1, 80137 Napoli, Italia;

² Dipartimento di Farmacia, Scuola di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli Federico II, Via Domenico Montesano 49, 80131 Napoli, Italia;

³ TaskForce on Microbiome Studies, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia

⁴ Veterinario Aziendale Gruppo Amadori, Via Del Rio n.400, 47522 San Vittore di Cesena (FC).

Summary

Helicobacter pullorum is recognized as an emerging food-borne pathogen that may colonize the intestinal tract and the liver of avian species and humans causing several gastrointestinal and liver diseases. However, not all strains are reported to be capable of causing clinical disease, thus making poultry as reservoir for the zoonotic transmission of the infection through carcass contamination of broilers at slaughter. In poultry, the prevalence of this bacterium could be underestimated, and the available data mainly refer to conventional rearing systems, whereas free-range and organic breeding have been poorly investigated. Therefore, this study was aimed to characterize the caecal microbiota community of free-range grown chickens and determine the presence and the relative abundance of *H. pullorum* by using NGS-based 16S rDNA sequencing. A total of 18 chickens reared for 56 days on a semi-extensive management system were euthanized at two time points: 9 birds at 28 days of age (before have access to outdoor; I= Indoor) and other 9 birds at 56 days of age (before slaughter; O= Outdoor). Caecal contents were collected for microbiota analyses. *H. pullorum* was detected in the cecum of 16/18 samples and its proportion in indoor was significantly higher than outdoor chickens (2.46% and 0.52%, respectively; $p < 0.05$), showing 78.8% of decrease with the outdoor access of the chickens. Therefore, it may be assumed that the potential for zoonotic infection is less likely. Moreover, *H. pullorum* was negatively correlated with 17 bacterial species as significantly more abundant in Outdoor microbial caecal communities. Among these, we highlighted the presence of *Mucispirillum schaedleri* and *Oscillospira*, already previously associated with a healthy gut and thus representing promising gut bacterial markers for host health. Our findings suggest that alternative production systems with outdoor access, may play a crucial role in the establishment of a healthy gut microbiota, which in turn might prevent colonization of harmful bacteria such as *Helicobacter pullorum*.

INTRODUZIONE

Helicobacter pullorum è una specie enteroepatica di *Helicobacter* (EHS) recen-

temente riconosciuto come un patogeno umano emergente a trasmissione alimentare. Fu descritto per la prima volta da Stanley et al. (1994) nell'uomo e nel pollo e, successivamente, in diverse specie animali tra cui tacchini, faraone, psittacidi, topi e ratti (1). Questo microrganismo Gram-Negativo è stato isolato dall'intestino e dal sistema epatobiliare sia di polli asintomatici che dal fegato e dal contenuto cecale di galline affette da epatite vibrionica (2). Inoltre, *H. pullorum* è stato associato nell'uomo a casi di diarrea, gastroenterite, malattia infiammatoria intestinale, malattia epatobiliare e cancro epatico, sia in soggetti immunocompetenti che immunocompromessi. Il potenziale zoonotico di *H. pullorum* è emerso in seguito al suo isolamento dalla carne di pollo, poiché le carcasse possono essere contaminate con il contenuto cecale durante la macellazione e le diverse procedure di manipolazione. Pertanto, i prodotti a base di carne di pollo, non adeguatamente cotti, costituiscono una delle principali fonti di infezione per l'uomo (1). Allo stato attuale delle conoscenze scientifiche, sono stati caratterizzati pochi meccanismi patogenetici e relativi determinanti molecolari, tuttavia il loro ruolo nell'infezione da *H. pullorum* non è stato ancora del tutto compreso. Studi *in vitro* hanno evidenziato proprietà proinfiammatorie legate alla cytolethal distending toxin (CDT), al lipopolisaccaride (LPS) e all'induzione dell'IL-8 attraverso il pathway NF- κ B delle cellule epiteliali (3). Inoltre, è stato dimostrato che l'infezione da *H. pullorum* attiva i macrofagi dell'ospite e la secrezione di altre citochine (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e murine MIP-2), nonché la produzione di ossido nitrico nei macrofagi di topo. Recenti indagini hanno evidenziato in *H. pullorum* il sistema di secrezione di tipo VI come importante fattore di virulenza coinvolto nella patogenesi interagendo con le vescicole endocitiche e innescando l'adesione e l'invasione delle cellule epiteliali intestinali (1). Nonostante l'incremento dei casi clinici riportati, la prevalenza di *H. pullorum* potrebbe essere sottostimata a causa delle diverse caratteristiche fenotipiche in comune con *Campylobacter* spp. e delle particolari esigenze di crescita che ne ostacolano l'isolamento. Nel pollame i tassi di prevalenza presentano un range molto ampio che va dal 4 al 100% a seconda dei metodi di isolamento, del tipo di campione, dell'area geografica e delle pratiche di allevamento (4). Sulla base dell'attuale letteratura scientifica, i dati disponibili si riferiscono principalmente a sistemi di allevamento convenzionali, mentre quelli relativi agli allevamenti free-range e biologici sono molto scarsi. In uno studio condotto in Italia da Manfreda et al. (3), è emerso che nei polli allevati con metodo free-range la prevalenza di *H. pullorum* era significativamente più bassa (i.e., 57%) rispetto a quelli allevati con metodi convenzionali (i.e., 84%) o con il biologico (i.e., 97.4%), anche se resta ancora da chiarire la relazione tra tali risultati e l'influenza di fattori ambientali, dell'età degli animali e della dieta. Poiché le tecniche di allevamento, e in particolare l'utilizzo di antibiotici, possono influenzare la composizione del microbiota cecale del pollo, questo studio ha lo scopo di caratterizzare il microbiota cecale di polli free-range e determinare la presenza e l'abbondanza relativa di *H. pullorum* attraverso il sequenziamento del 16 S rDNA al fine di comprendere meglio l'influenza del microbiota intestinale sulla presenza di tale patogeno. Inoltre, l'identificazione di taxa microbici che possono essere correlati all'assenza o all'aumento della presenza di questo batterio potrebbe fornire nuove informazioni per lo sviluppo di strategie di esclusione competitiva con la

finalità di ridurre la prevalenza di *H. pullorum* nelle specie serbatoio di questo patogeno emergente a trasmissione alimentare.

MATERIALI E METODI

Animali e condizioni di allevamento

Per il presente studio, sono stati selezionati incroci Hubbard (ISA 956) provenienti da un allevamento a marchio certificato del sud Italia. I polli sono stati allevati per 56 giorni con un sistema di gestione semi-estensivo caratterizzato dall'uso di mangimi privi di OGM e dalla totale assenza di antibiotici (dal 29° giorno di età i polli avevano libero accesso alle aree esterne, includendo nella dieta altri elementi vegetali, semi, frutti, insetti e particelle di terreno) e macellati con un peso corporeo medio di 2 Kg. Il mangime, fornito ad libitum, era costituito per il 50-60% da cereali e diverse proporzioni di frumento e soia a seconda del fabbisogno di età (1-28 gg 5% frumento e 30% soia, 29-56 gg 11% frumento e 24% soia), integrato con carbonato di calcio, fosfato bicalcico, cloruro di sodio e bicarbonato di sodio. I vaccini somministrati erano quelli contro la malattia di Newcastle, la bronchite infettiva e la bursite infettiva.

Campionamento

Durante l'intero periodo produttivo (Febbraio- Marzo 2019), un totale di 18 polli sono stati selezionati casualmente in due *time-point*: 9 polli a 28 giorni di età (prima dell'accesso all'esterno; I= Indoor) e altri 9 polli a 56 giorni di età (prima della macellazione; O= Outdoor). Tutti i soggetti sono stati sottoposti a eutanasia per dislocazione cervicale e sezionati in condizioni sterili. Da ciascun cadavere, i ciechi sono stati legati alle due estremità, separati con strumenti sterili dal resto del tratto gastrointestinale, posti in una provetta Falcon sterile da 15 ml e conservati a -80°C.

Sequenziamento del microbiota ed analisi dei dati

Il DNA genomico batterico è stato estratto da circa 0.18 g di contenuto cecale utilizzando il kit QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen) secondo le istruzioni del produttore, quantificato al NanoDrop e sottoposto ad elettroforesi in gel d'agarosio allo 0.8%. I campioni di DNA sono stati conservati a -20°C fino alla processazione per l'amplificazione. Le librerie per il sequenziamento delle regioni V3 e V4 sono state preparate secondo il protocollo del 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation for Illumina Miseq System e sequenziate secondo quanto riportato da Borrelli et al. (2017) (5). I dati relativi alle sequenze sono stati importati nel software QIIME2 (v2021.4) per l'analisi (6). Le letture sono state filtrate, tagliate e controllate per le chimere utilizzando il plugin DADA2 (7) che ha generato varianti uniche di ampliconi (ASVs). Successivamente, le ASVs sono state classificate con QIIME2 utilizzando il database SILVA v138 con un classificatore specifico per le regioni amplificate (8). Le differenze tra i gruppi a livello di specie sono state determinate attraverso il test t di Student corretto con il Benjamini-Hochberg *false discovery rate* (FDR). Le correlazioni tra *H. pullorum* e le altre specie batteriche identificate sono state calcolate con l'analisi di correlazione di Spearman.

Inoltre, le interazioni microbiche sono state esplorate generando uno Spearman

co-occurrence network basato sull'abbondanza relativa delle specie risultate significativamente diverse tra i due gruppi, utilizzando il CoNet plugin (9) per Cytoscape (3.9.0) (10) e applicando i seguenti parametri: coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman con una soglia minima di esclusione di 0.6 ($p < 0.05$, con correzione di Bonferroni).

RISULTATI

Dei 18 campioni sequenziati è risultato un totale di 18,473 sequenze assegnate in 3,104 ASVs, con una media di 10,526.28 sequenze per campione (il valore più basso osservato per un campione era di 5,766 sequenze ed il più alto di 14,787 sequenze). L'analisi delle curve di rarefazione ha mostrato che con il numero minimo di 5,766 sequenze/campione è stata ottenuta una buona profondità di sequenziamento e una copertura adeguata delle specie costituenti il microbiota di ciascun campione. La maggior parte delle sequenze (99.87%) erano rappresentate da sequenze batteriche (103,650), seguite da sequenze di Archaea (137 sequenze, 0.13%) ed una sequenza non classificabile (0.001%).

H. pullorum è stato rilevato dal contenuto cecale di 16/18 campioni, con una prevalenza dell'88.9%. La proporzione di *H. pullorum* nel gruppo Indoor si è rivelata significativamente più elevata rispetto al gruppo Outdoor (2.46% e 0.52%, rispettivamente; $p < 0.05$), mostrando una riduzione del 78.8% alla fine del periodo di accesso all'esterno dei polli (Fig.1 A), valore ottenuto calcolando la percentuale media della riduzione di *H. pullorum* nel gruppo Outdoor rispetto al gruppo Indoor.

Inoltre, *H. pullorum* è risultato correlato negativamente con 45 specie batteriche, di cui 22 hanno mostrato un coefficiente di correlazione di Spearman < -0.6 . Successivamente, la comparazione dell'abbondanza relativa ha identificato 17 specie batteriche significativamente più abbondanti (abbondanza relativa $> 0.5\%$) nella comunità microbica cecale del gruppo Outdoor (Fig.1B). In particolare, si evidenzia la comparsa di *Mucispirillum schaedleri* (0% e 1.34% in Indoor e Outdoor, rispettivamente) e del genere *Oscillospira*. Tali risultati suggeriscono che queste specie batteriche possono rappresentare degli specifici competitors di *H. pullorum* acquisiti durante la fase di allevamento all'aperto.

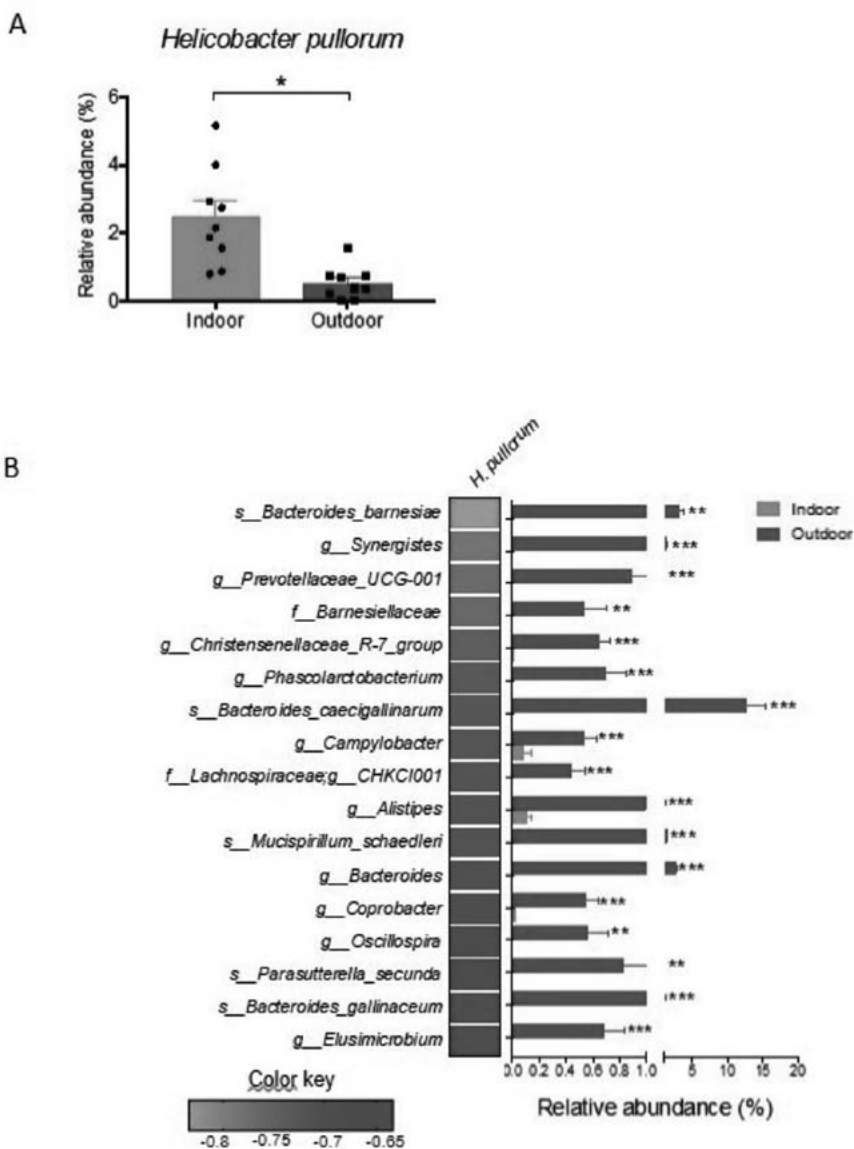


Figura 1 A) Abbondanza relativa di *H. pullorum* nei polli Indoor e Outdoor (2.46% e 0.52%, rispettivamente; $p < 0.05$) che mostra una riduzione del 78.8% con l'accesso all'aperto dei polli. **B)** Specie batteriche significative che correlano negativamente con *H. pullorum* (Coefficienti di correlazione di Spearman < -0.6). A sinistra: Heatmap evidenzia le specie batteriche con più alta (verde) e più bassa (rossa) correlazione con *H. pullorum*. A destra: media dell'abbondanza relativa delle specie batteriche significativamente differenti tra i polli Indoor e Outdoor sulla base del test t di Student corretto con il Benjamini-Hochberg *false discovery rate* (FDR); sono state elencate solo le specie con un'abbondanza relativa > 0.5 % in almeno un gruppo).

Un network di *co-occurrence and mutual exclusion* è stato creato per esplorare le interazioni microbiche tra le specie batteriche identificate e per individuare potenziali mediatori dello specifico assortimento microbico generato in risposta al passaggio dal sistema di allevamento Indoor a quello Outdoor. Il network è risultato costituito da 14 nodi (specie microbiche) collegati da 30 connessioni significative. *Bacteroides barnesiae* e un microorganismo non identificato del genere *Synergistes* erano le specie con il numero più elevato di connessioni e con l'indice di *closeness centrality* più alto, implicando la co-presenza di altre 7 specie batteriche e risultando, inoltre, negativamente correlate a *H. pullorum*. Infine, *H. pullorum* ha mostrato anche un'associazione negativa (indice di possibile esclusione mutualistica) con la specie *Bacteroides gallinaceum* e un'interazione di co-presenza con *Bacteroides vulgatus* (Fig. 2).

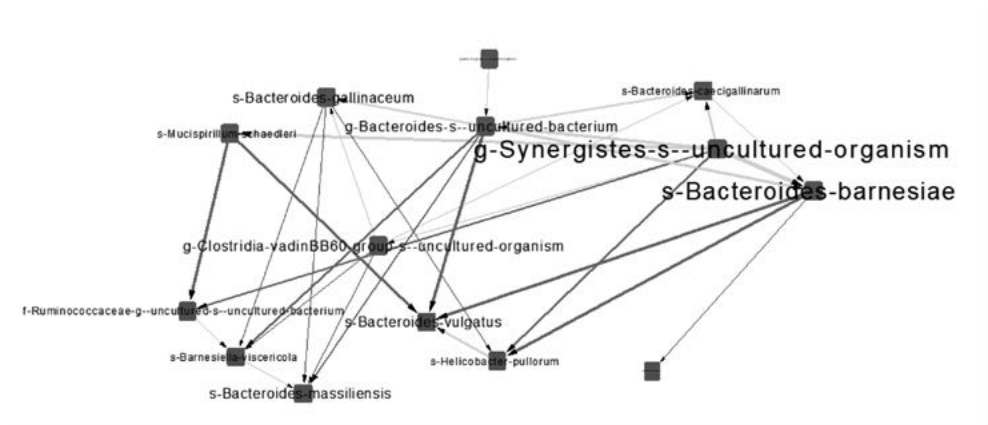


Figura 2. Network di *co-occurrence and mutual exclusion* delle specie discriminanti i gruppi Indoor e Outdoor. Nel network: i nodi rappresentano le specie e le linee (connessioni) mostrano le correlazioni non parametriche di Spearman con un coefficiente di correlazione > 0.6 (co-presenza) o < -0.6 (esclusione competitiva) statisticamente significativa ($p < 0.05$ con correzione Bonferroni); le connessioni verdi e rosse denotano rispettivamente un effetto positivo o negativo, dove la direzione delle frecce mostra la direzione dell'effetto; le dimensioni delle linee sono proporzionali all'indice di *closeness centrality*, parametro usato per misurare la centralità di un nodo nel network; i nodi blu e rossi rappresentano rispettivamente le specie batteriche risultate associate ai gruppi Indoor e Outdoor.

DISCUSSIONE

Helicobacter pullorum è un patogeno dal potenziale zoonotico in grado di colonizzare il tratto intestinale ed il fegato di specie aviari e dell'uomo provocando diverse patologie gastrointestinali ed epatiche. Negli avicoli, la prevalenza di questo microorganismo è sicuramente sottovalutata a causa delle sue particolari esigenze di crescita e della somiglianza fenotipica con alcune specie di *Campylobacter*, in particolare *C. coli* e *C. lari* (2). Data la scarsità e la natura frammentaria dei dati

disponibili in letteratura sulla presenza di *H. pullorum* nel pollame, il presente studio è stato concepito con l'intenzione di fornire una fotografia globale di un sistema di produzione semi-estensivo esaminando due momenti fondamentali del ciclo produttivo dei polli, relativamente alla presenza di questo patogeno zoonotico emergente.

È interessante notare come i nostri risultati abbiano mostrato una diminuzione significativa (78.8%) dell'abbondanza di *H. pullorum* nei polli con accesso all'aperto rispetto a quelli allevati al chiuso. Il primo time-point individuato è stato a 28 giorni di età, in quanto questo momento rappresenta il passaggio dall'allevamento al chiuso a quello all'aperto, quando il microbiota ha raggiunto un certo livello di maturità, pur considerando che lo sviluppo della comunità microbica sia una successione dinamica influenzata sia da processi correlati all'età che da fattori ambientali (cambiamenti nell'alimentazione, sviluppo del sistema immunitario ed esposizione a microrganismi estranei). Il secondo time-point (56 giorni di età) preso in esame rappresenta la fase finale di questo sistema produttivo e corrisponde al momento della macellazione, consentendo, pertanto, di valutare la composizione del microbiota cecale alla fine dell'intero periodo di accesso all'aperto. Sebbene *H. pullorum* sia stato associato a casi di enterite o epatite vibriónica negli avicoli, non tutti i ceppi sono responsabili di malattia clinica e si comportano come flora innocua del tratto intestinale, rendendo il pollame una specie serbatoio nella trasmissione zoonotica dell'infezione. Il meccanismo alla base di questo fenomeno non è del tutto noto, tuttavia potrebbe spiegarsi con la presenza di ceppi a differente virulenza. Infatti, contrariamente a quanto osservato per *Campylobacter*, non tutte le EHSs esprimono l'attività della CDT ed i relativi geni che svolgono probabilmente un ruolo eziologico nello sviluppo dei segni clinici e diarrea (2). Sulla base di tali considerazioni, il nostro studio ha documentato che alla fine del periodo produttivo, tutti gli animali si mostravano clinicamente sani e non si evidenziavano segni clinici di malattia, diarrea e mortalità. Alla necropsia non si evidenziavano segni di tiflite né lesioni macroscopiche nel tratto gastrointestinale. Sarebbe auspicabile una caratterizzazione genomica e molecolare per studiare la patogenicità di *H. pullorum* e i profili di virulenza più prevalenti, approfondendo, così, il suo potenziale zoonotico. Finora esso è stato associato approssimativamente al 12% di casi nell'uomo (1) in seguito alla contaminazione delle carcasse alla macellazione, in quanto tale agente patogeno è stato rilevato in un numero elevato di campioni cecali, dimostrando di essere in grado di persistere nei polli fino all'età della macellazione. Pertanto, dai risultati del presente studio si può ipotizzare che il potenziale zoonotico dell'infezione (attraverso la contaminazione delle carcasse) sia inferiore dopo un periodo di allevamento all'aperto.

Sulla base dei due time-point analizzati, gli stadi sopra descritti della vita produttiva dei broiler documentano pienamente l'evoluzione delle comunità microbiche come un processo continuo in cui nuovi taxa ne sostituiscono altri con l'accesso all'aperto dei polli e l'introduzione nella dieta di nuove fonti alimentari. Di conseguenza, si può supporre che la maggiore diversità microbica e l'espansione di altri taxa associati ad un intestino sano possano ridurre la probabilità di colonizzazione intestinale di *H. pullorum*. È di notevole interesse, infatti, la comparsa un mese dopo l'accesso all'aperto di nuovi phyla tra cui *Deferribacteres*, e, a livello di specie, l'insorgenza di *Mucispirillum schaedleri* (0% e 1.34% in Indoor e

Outdoor, rispettivamente). Quest'osservazione è in linea con altri studi che hanno descritto la comunità microbica intestinale di polli allevati con sistema free-range. *M. schaedleri* è noto per far parte della nicchia microbica associata al muco intestinale e, pertanto, può essere considerato un marker per la salute del tratto distale dell'intestino (11). Inoltre, altri studi riportano che questo batterio sia in grado di proteggere dalla colite indotta da *Salmonella* Typhimurium nel topo interferendo con l'espressione dei geni responsabili dell'invasione ed avendo, quindi, un potenziale per l'utilizzo terapeutico contro le infezioni da *Salmonella* nell'uomo (12). Il gruppo di polli allevati all'aperto ha evidenziato anche un aumento di *Oscillospira*, un genere batterico candidato tra i probiotici di nuova generazione con un elevato potenziale per l'utilizzo in campo medico. *Oscillospira* svolge un ruolo importante nel microbiota intestinale e la sua abbondanza è strettamente correlata alla salute dell'ospite. Nell'allevamento avicolo, l'utilizzo di probiotici e polifenoli influenza significativamente l'abbondanza di *Oscillospira* nell'intestino, migliorando l'incremento ponderale e la salute intestinale nei broiler. Inoltre, l'abbondanza di *Oscillospira* è correlata a una significativa riduzione della trasmissione orizzontale di ceppi patogeni di *E. coli* e della gravità dell'infezione nei pulcini prevenendo, inoltre, la patologia infettiva associata a *Clostridium difficile* (CDAD) nell'uomo, di cui il pollame rappresenta un possibile serbatoio (5, 13).

CONCLUSIONI

Il microbiota intestinale del pollo svolge un ruolo cruciale nel mantenimento della salute dell'ospite ed il nostro studio suggerisce che il sistema di produzione e, in particolare, i sistemi di produzione alternativi, con accesso all'aperto, possono essere considerati fattori rilevanti nella costituzione di un microbiota intestinale sano. In particolare, sia *Mucispirillum schaedleri* che *Oscillospira* sono noti per esprimere proprietà microbiche benefiche con un interessante potenziale in qualità di markers batterici intestinali per la salute dell'ospite. Questi microrganismi potrebbero essere in grado di modulare la suscettibilità alle infezioni, come nel caso di *Helicobacter pullorum*, principalmente attraverso l'esclusione competitiva prevenendone, pertanto, la colonizzazione intestinale. Nel pollo, quindi, un microbiota intestinale sano può avere una forte influenza sia sulla salute dell'ospite che sulla produttività, oltre che sulla salute dei consumatori.

BIBLIOGRAFIA

1. Abd El-Ghany W. (2020). *Helicobacter pullorum*: A potential hurdle emerging pathogen for public health. *J. Infect. Dev. Ctries.* 14:1225-1230.
2. Ceelen LM, Decostere A, Chiers K, Ducatelle R, Maes D and F Haesebrouck. (2007). Pathogenesis of *Helicobacter pullorum* infections in broilers. *Int. J. Food Microbiol.* 116:207-13.
3. Manfreda G, Parisi A, Lucchi A, Zanoni RG and A De Cesare. (2011). Prevalence of *Helicobacter pullorum* in conventional, organic, and free-range broilers and typing of isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:479-84.
4. Javed S, Gul F, Javed K and H Bokhari. (2017). *Helicobacter pullorum*: An Emerging Zoonotic Pathogen. *Front Microbiol.* 10:8:604.
5. Borrelli L, Coretti L, Dipineto L, Bovera F, Menna F and L Chiariotti. (2017). Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota

- composition and SCFAs production in laying hens. *Sci. Rep.* 16269.
6. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, et al. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37, 852–857.
 7. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ and SP Holmes. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* 13:581–3.
 8. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue): D590–6.
 9. Faust K and J Raes. (2016). CoNet app: inference of biological association networks using Cytoscape. *F1000Res.* 5:1519.
 10. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13:2498–504.
 11. Ocejo M, Oporto B and A Hurtado. (2019). 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. *Sci. Rep.* 9, 2506.
 12. Herp S, Durai Raj AC, Salvado Silva M, Woelfel S and B. Stecher. (2021). The human symbiont *Mucispirillum schaedleri*: causality in health and disease. *Med. Microbiol. Immunol.* 210:173-179.
 13. Yang J, Li H, Wen Z, Liu W, Meng L and H Huang. (2021). *Oscillospira* - a candidate for the next-generation probiotics. *Gut Microbes.* 13:1987783.