

## MICROBIOTA GASTROINTESTINAL EN EL PAVO (*MELEAGRIS GALLOPAVO*) AFECTADO POR EL VIRUS DE LA ENTERITIS HEMORRÁGICA

D'Andreano<sup>1,2</sup>, S., Sánchez Bonastre<sup>2</sup>, A., Francino<sup>2</sup>, O., Cuscó Martí<sup>1,2</sup>, A., Lecchi<sup>3</sup>, C., Grilli<sup>3</sup>, G., Giovanardi<sup>4</sup>, D. y Ceciliani<sup>3</sup>, F.

<sup>1</sup>Vetgenomics. Ed Eureka. Parc de Recerca UAB. 08193 Bellaterra, España.

<sup>2</sup>Molecular Genetics Veterinary Service. Veterinary School. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra, España.

<sup>3</sup>Department of Veterinary Science. Università di Milano. 20133 Milano, Italia.

<sup>4</sup>Laboratorio Tre Valli. 37132 San Michele Extra, Verona, Italia.

sara.dandreano@vetgenomics.com

### INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal está colonizado por población comensal bacteriana, que es esencial para el desarrollo del intestino, la fisiología y la digestión. Además permite interacciones únicas con el sistema inmunitario, influyendo sobre la homeostasis en las células (Oakley et al., 2014). En las especies avícolas, la microbiota gastrointestinal está formada por bacterias, levaduras, hongos, protozoos y virus. Las primeras son las predominantes, y su composición fluctúa durante el crecimiento, dependiendo también de la dieta, la edad y la localización geográfica de los animales.

Los phyla bacterianos más abundantes en las especies aviarias son *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, mientras que a nivel de familia, la más abundante es *Lactobacillaceae*. La aplicación de la técnica de secuenciación masiva permite definir mejor la composición microbiana y determinar si hay relación con algunas enfermedades.

La enteritis hemorrágica es una enfermedad viral aguda que afecta a los pavos a partir de 4 semanas de vida. El virus es el adenovirus 3 (TAdV-3) y se transmite vía fecal, oral y cloacal; es la causa de graves pérdidas de producción de carne de pavo en las empresas. Suponiendo que el virus puede influir sobre la población bacteriana del intestino, los objetivos de este estudio son: (1) definir la microbiota sana en los 4 tractos intestinales del pavo, y (2) valorar en yeyuno si la microbiota se ve afectada por el virus de la enteritis hemorrágica.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio ha sido realizado en 12 pavos de 80 días, en el 2015. Los animales provienen de una granja de producción de carne de pavo en Italia (región de Véneto). Los pavos se han dividido en tres grupos según el estado de salud: animales sanos (grupo A), animales enfermos (grupo B), y animales positivos al virus pero que todavía no presentaban síntomas (grupo C). Las muestras se han cogido, después de la eutanasia, pasando un *scrap* (Cell Scrapers, Sterile, Greiner Bio-One) en 2 cm de cada tracto intestinal (duodeno, yeyuno, íleon y ciego). Del grupo B y C, solo se ha cogido la parte del yeyuno, porque es donde más se desarrolla la enfermedad. El ADN bacteriano se extrae con el kit de extracción Powersoil® DNA (MoBio): en total tenemos 4 muestras de duodeno, 4 de íleon, 4 de ciego y 12 muestras de yeyuno (4 por cada grupo). Mediante PCR se amplifican las regiones hipervariables V1-V2 del gen 16S rRNA, y al final se secuencia con *Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM)* utilizando la plataforma *Ion 318 Chip Kit v2 (Life Technologies)*. Las secuencias se analizaron mediante QIIME 1.9.1 (Caporaso et al., 2011), y se posteriormente se llevaron a cabo los análisis estadísticos, ADONIS y ANOSIM, de los resultados.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio se divide en dos partes: en la primera se investiga la microbiota del pavo sano (B.U.T. BIG6), y en la segunda se investiga la enteritis hemorrágica y su relación con la microbiota intestinal.

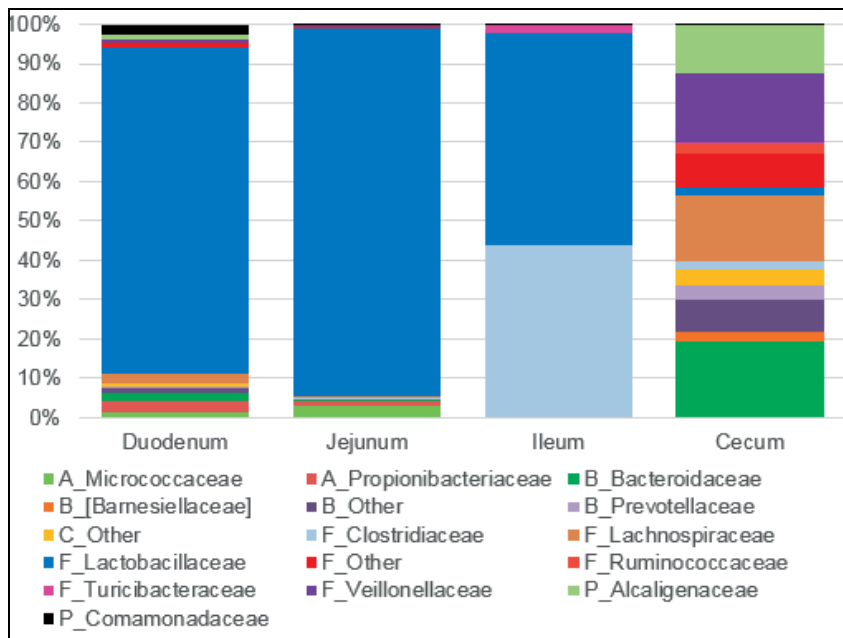
En el duodeno, yeyuno e íleon, la microbiota está distribuida de manera homogénea (Figura 1): *Firmicutes* es el phylum más abundante. A nivel de familia, las más abundantes son *Lactobacillaceae* y *Clostridiaceae*. En el tracto del ciego los phyla cambian: *Firmicutes* reduce su porcentaje, pero crecen los de *Proteobacteria* y

*Bacteroidetes*. No hay diferencias significativas entre animales ni entre duodeno, yeyuno e íleon, lo que puede ser debido a que hayan crecido en la misma bandada, a que la dieta sea la misma y a que tengan la misma edad. Se evidencian diferencias estadísticas significativas comparando el ciego con los otros tractos. Aplicando el test estadístico de ADONIS se obtiene un  $p$ -valor de 0,001. El valor  $R^2$  es de 0,43, indicando que aproximadamente el 43% de la variación está explicada por la división de las muestras por tractos intestinales.

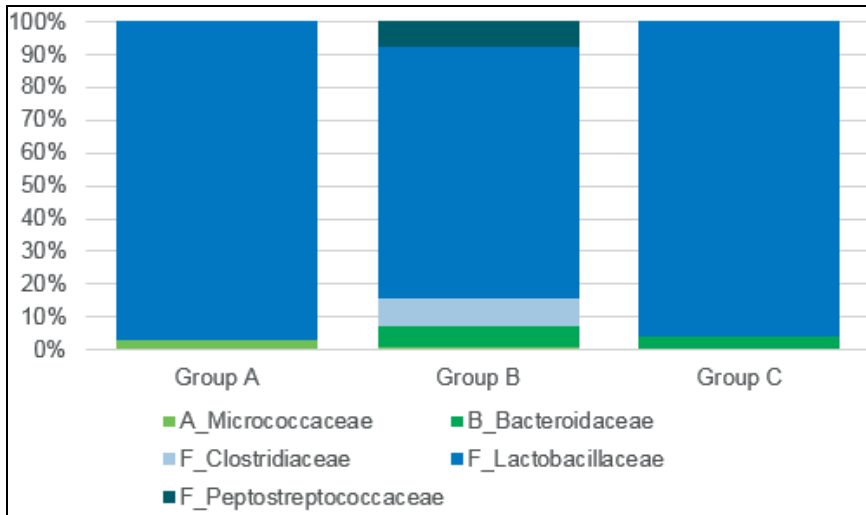
Después de los análisis entre los diferentes tractos intestinales, se comparan las poblaciones bacterianas de los tres grupos de muestras de yeyuno (“A” sanos, “B” enfermos, “C” positivos para el virus pero sin síntomas) (Figura 2). En el grupo B, el porcentaje de *Lactobacillaceae* baja y el de *Clostridiaceae* aumenta. También hay otras familias bacterianas, *Bacteroidaceae* y *Peptostreptococcaceae*, que están relacionadas con las enfermedades en el pavo y se encuentran en porcentaje más alto en los grupos B y C. Una hipótesis sobre la inmunopatogénesis de la enteritis hemorrágica es que después de la exposición oral, el virus empiece a replicarse en los linfocitos B (en la bolsa de Fabricius), o que puedan ir directamente al bazo por sangre periférica, donde puede afectar más a los linfocitos B. Los análisis estadísticos no evidencian diferencias significativas entre los grupos, debido a que puede ser que haya pocas muestras por grupo. Sería interesante hacer nuevos análisis con más muestras para poder investigar mejor esta enfermedad y su relación con la microbiota.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, K., Gordon, J.I., Huttley, G., Kelley, S.T., Knights, D., Jeremy, E., Ley, R.E., Lozupone, C., Mcdonald, D., Muegge, B.D., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J. & Walters, W. 2011a. NIH Public Access. 7: 335–336.
- Oakley, B.B., Lillehoj, H.S., Kogut, M.H., Kim, W.K., Maurer, J.J., Pedroso, A., Lee, M.D., Collett, S.R., Johnson, T.J. & Cox, N.A. 2014. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiol. Lett.* 360: 100–112.



**Figura 1.** La población bacteriana en los cuatro tractos intestinales sanos.



**Figura 2.** La población bacteriana en los tres grupos de muestras de yeyuno (“A” sanos, “B” enfermos, “C” positivos por el virus pero sin síntomas).

#### **GASTROINTESTINAL MICROBIAL POPULATION OF TURKEY (MELEAGRIS GALLOPAVO) AFFECTED BY HAEMORRHAGIC ENTERITIS VIRUS**

**ABSTRACT:** Haemorrhagic enteritis (HE) is an acute viral disease that affects avian species, particularly turkeys, compromising their commercial production and having a negative effect on animal welfare. Turkey adenovirus 3 (TAdV-3), is the main causal agent of the disease; the purpose of this study was (1) to investigate the microbiota of the intestine in healthy turkeys, and also (2) the relationship between natural infections with this virus and the microbiota of the jejunum, where HE mostly develops. (1) The microbial contents of the four tracts of the intestine (duodenum, jejunum, ileum and cecum) were analysed. Then (2) the microbiota of jejunum tract in three groups of turkeys was compared: (group A) healthy animals; (group B) animals with clinical signs of HE; (group C) animals with molecular positivity for the virus but without clinical signs. Massive sequencing of the hypervariable V1-V2 regions of 16 rRNA gene and QIIME 1.9.1 software analysis were performed; operation taxonomic units (OTUs) were classified into four abundant phyla: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. As compared with small intestine, cecum microbial community was much more heterogeneous: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*. In the natural infections of HEV, the main bacterial families were *Bacteroidaceae* (*Bacteroidetes*) and *Peptostreptococcaceae* (*Firmicutes*), uniquely detected in group B and C. Also *Clostridiaceae* (*Firmicutes*) was detected, uniquely in group B.

**Keywords:** Gut microbiota, hemorrhagic enteritis, turkey, 16S