

30 de Setembro 2022



Caracterização do microbioma da peeira através da utilização de novas tecnologias de sequenciação

 ana.usie@cebal.pt

CEBAL - Centro de Biotecnologia Agrícola e Agro-alimentar do Alentejo / IPBeja - Instituto Politécnico de Beja, 7801-908 Beja, Portugal.

MED – Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, CEBAL, 7801-908 Beja, Portugal.



Entidades promotoras:



Co-financiamento:



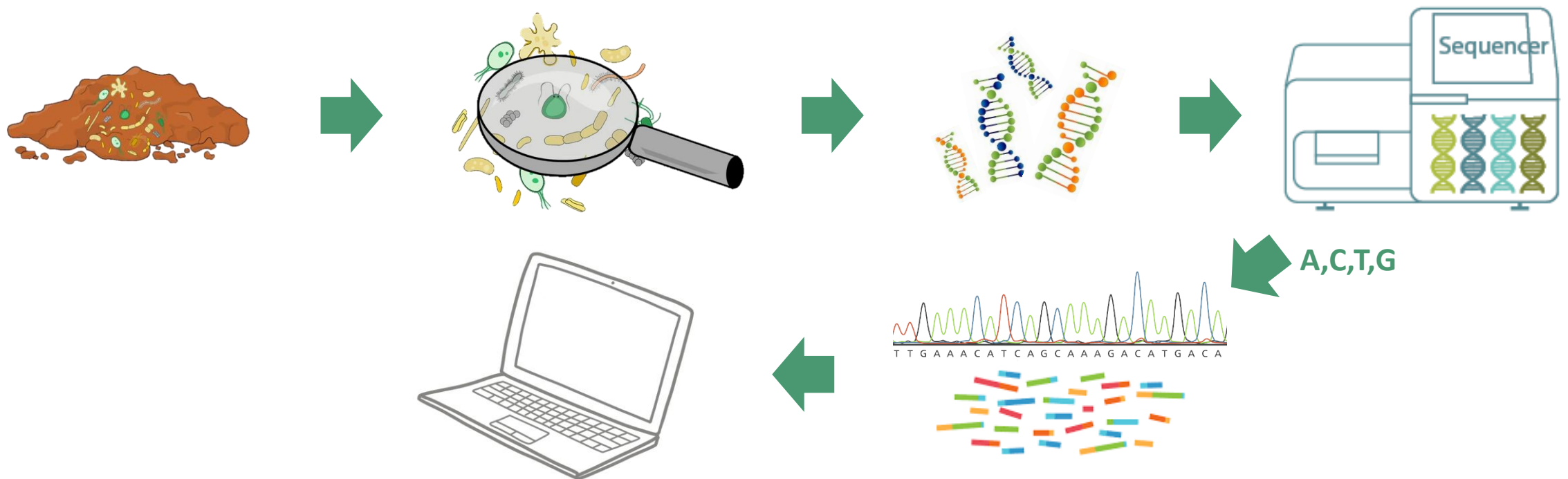
Introdução



Existem microrganismos que não podem crescer em cultura nos laboratórios, limitando o estudo dos mesmos com métodos mais tradicionais

As novas tecnologias de sequenciação nos permitem capturar todo o espectro da diversidade microbiana

A **metagenômica** é a análise genômica de comunidades microbianas por extração direta de ADN e posterior sequenciação do mesmo, permitindo o estudo de comunidades de microrganismos diretamente no seu ambiente natural



Materiais e Métodos



No contexto do projeto Gen-Res-Alentejo, realizaram-se exames de diagnóstico clínico de peeira a aproximadamente **1900 animais** distribuídos em **17 explorações** diferentes

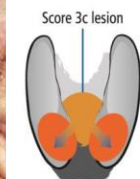
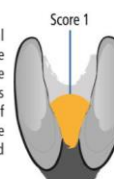


Normal Foot



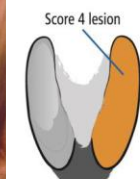
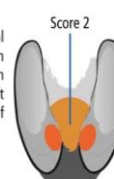
Score 3b:
Separation of the horn extends up to halfway across the heel or sole.

Score 1:
Limited mild interdigital dermatitis; slight to moderate inflammation confined to the interdigital skin and involves erosion of the surface layer of the skin. The skin between the toes is inflamed, red, moist and shedding hair.



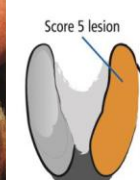
Score 3c:
More extensive separation of the heel or sole but not extending to the outside edge of the sole of the foot.

Score 2:
More extensive interdigital dermatitis; severe inflammation of the interdigital skin which involves part or all of the soft horn of the inside wall of the toe.



Score 4:
As for Score 3 but with the separation extending to the walls and outside edge of the sole of the foot.

Score 3a:
Separation at the skin horn junction, with under-running extending no more than 5 mm.



Score 5:
Necrotising inflammation of the deeper tissue of the outside wall with consequent separation of hard horn of the foot.
Horny layer detachment

Materiais e Métodos



No contexto do projeto Gen-Res-Alentejo, realizaram-se exames de diagnóstico clínico de peeira a aproximadamente **1900 animais** distribuídos em **17 explorações** diferentes



Ano	Localização Exploração	Exploração	Raça
2017	Castro Verde	A	Merino cruzado
	Évora	B	Merino branco
	Serpa	C	Merino branco
	Serpa	D	Merino preto
	Almodóvar	E	Merino cruzado
	Portel	F	Merino cruzado
	Ponte de Sor	G	Merino cruzado
	Montemor o Novo	H	Merino cruzado
	Alandroal	I	Merino cruzado
	Portalegre	J	Merino branco e cruzado
2018	Ferreira do Alentejo	K	Merino cruzado
	Alvito	L	Merino cruzado
	Portalegre	M	Merino branco
	Évora	N	Merino branco e cruzado
	Odemira	O	Merino cruzado
	Ponte de Sor	P	Merino cruzado
	Moura	Q	Merino branco e cruzado

Materiais e Métodos



- Em 210 animais examinados foram recolhidas 261 amostras de biópsia de tecido interdigital
- Após a extração de ADN e validação da sua qualidade 210 amostras foram sequenciadas para a análises de metagenómica.
- Em estas amostras realizou-se uma análises via PCR para identificar a presença do agente causal da peeira, *D. nodosus*. Em todas as amostras exceto nas que pertenciam às explorações D, I, J e Q, confirmou-se a presença de *D. nodosus*
- As amostras sem resultados positivos à presença de *D. nodosus* foram denominadas como “outgroup”.

	Nº Amostras
Score 0	52
Score 1	39
Score 2	35
Score 3	46
Score 4	16
Score 5	2
Outgroup	22

Pipeline bioinformática



Resultados



Pre-processamento das sequências de ADN



Biopsia



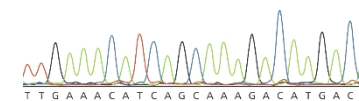
Fragmentos ADN



Sequências de ADN



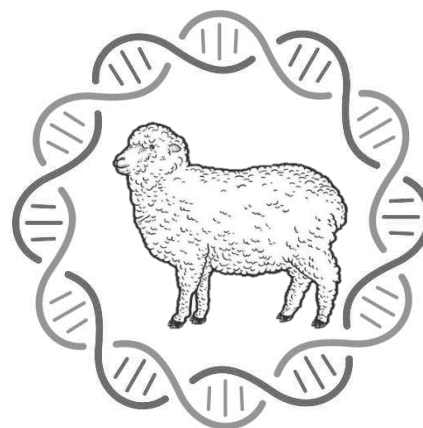
Sequências de ADN de alta qualidade



Deleção do ADN do hospedeiro



Sequências de ADN de alta qualidade



Genoma ovelha



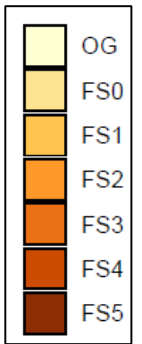
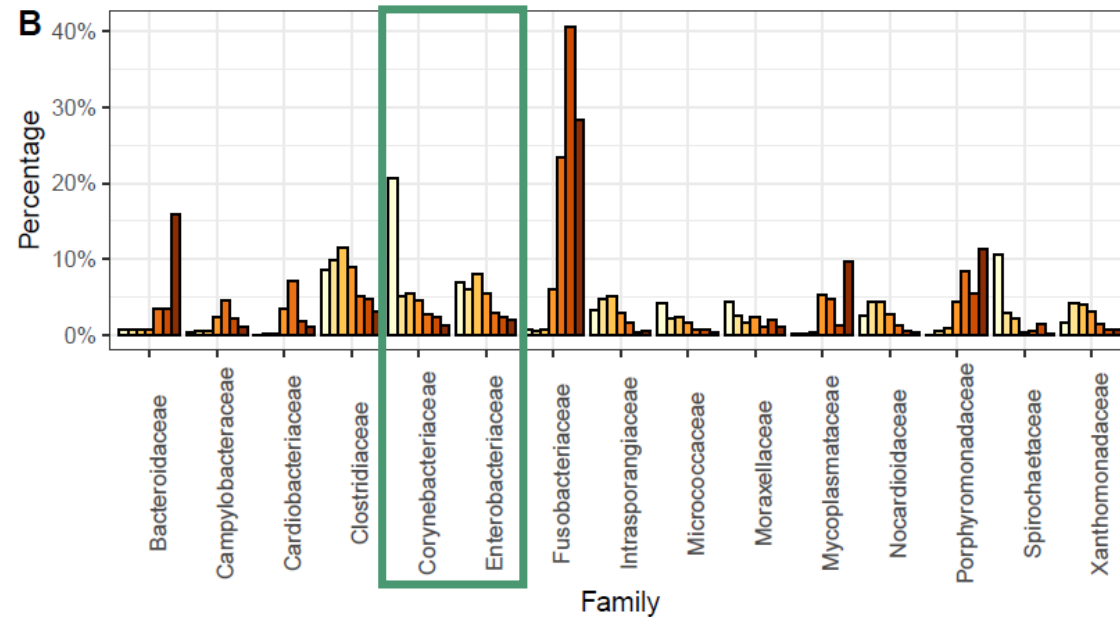
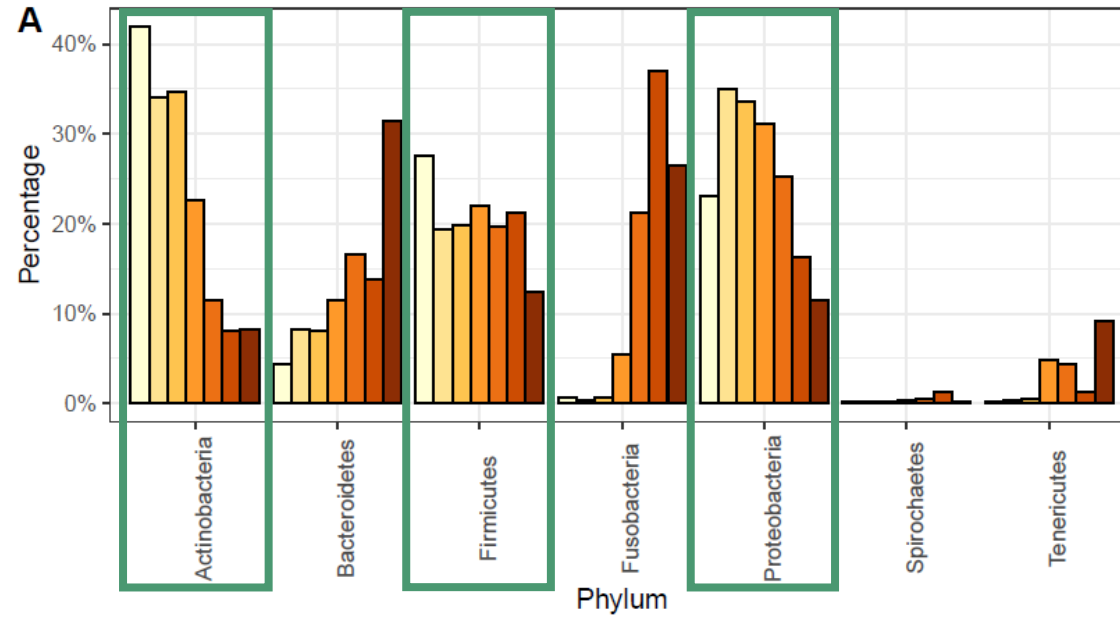
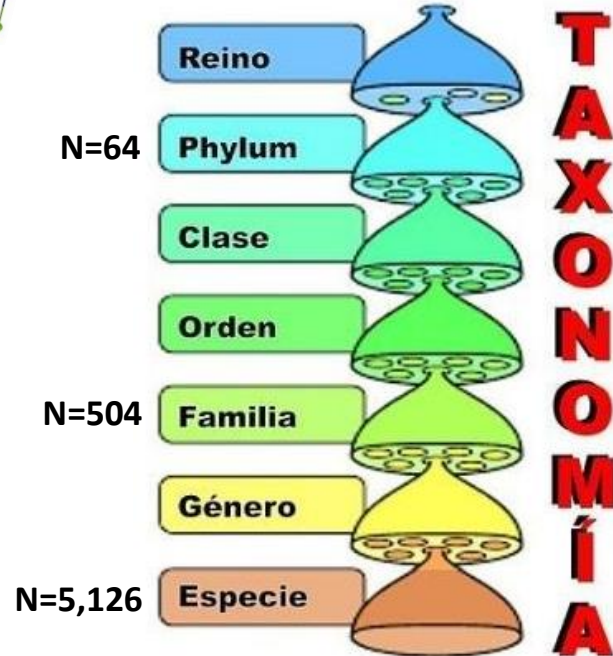
Sequências ADN microrganismos

Resultados



Classificação taxonômica

Sequências ADN microrganismos

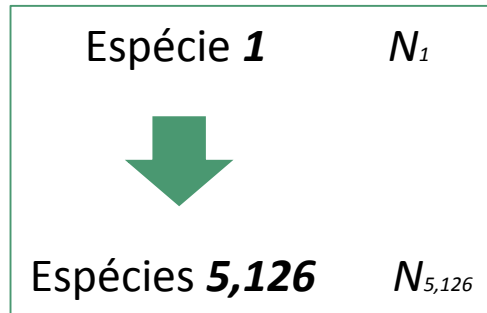
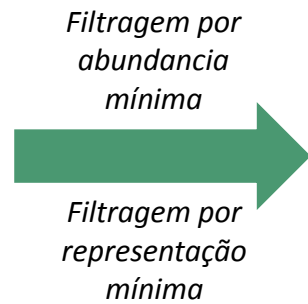
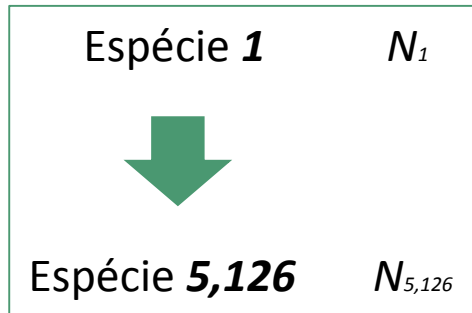
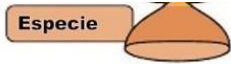


OG – Outgroup
FS – Score Peira

Resultados



Quantificação e Análises exploratórias



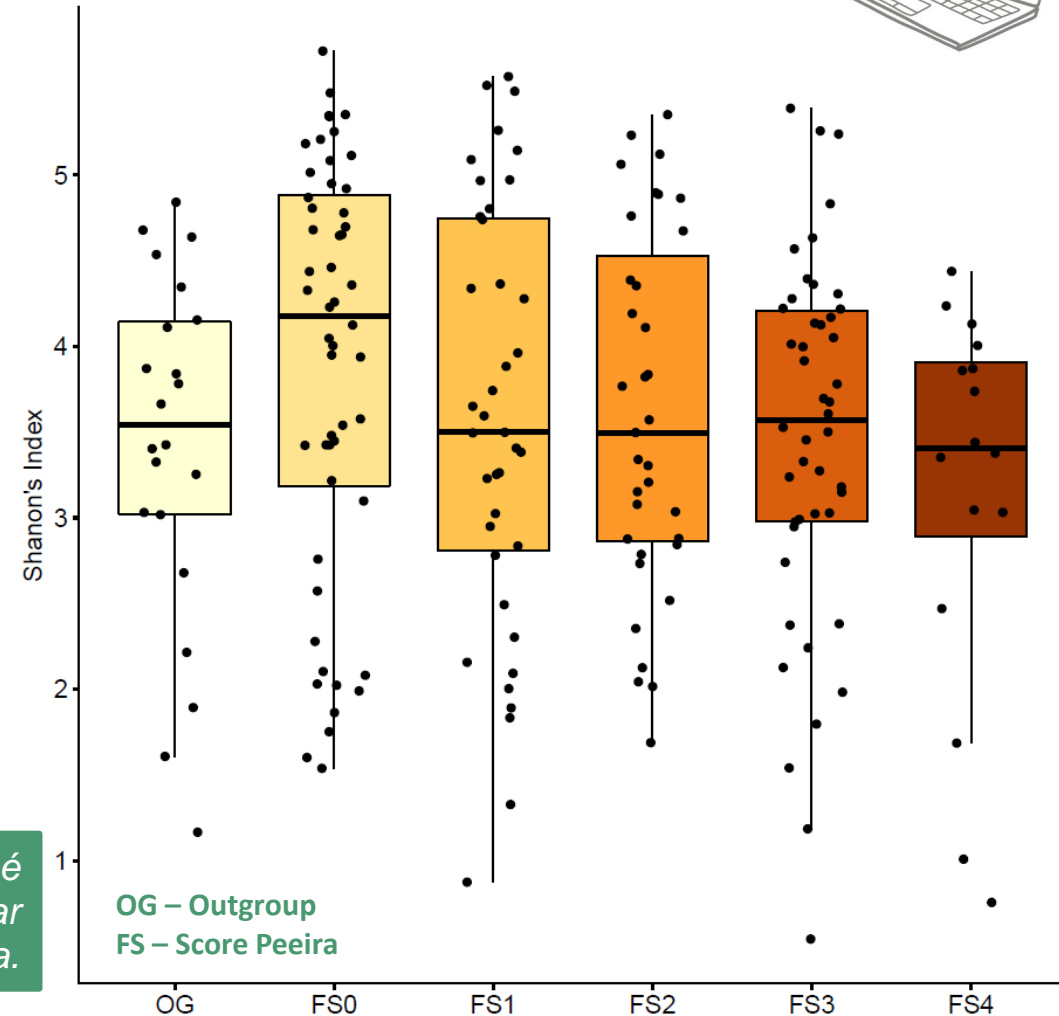
Nº Espécies 5,126

Nº Espécies 837

Nº Amostras	
Score 0	52
Score 1	39
Score 2	35
Score 3	46
Score 4	16
Score 5	2
Outgroup	22

**Excluídas por baixa
representação de
amostras o que iria
provocar "ruído" no
modelo estatístico**

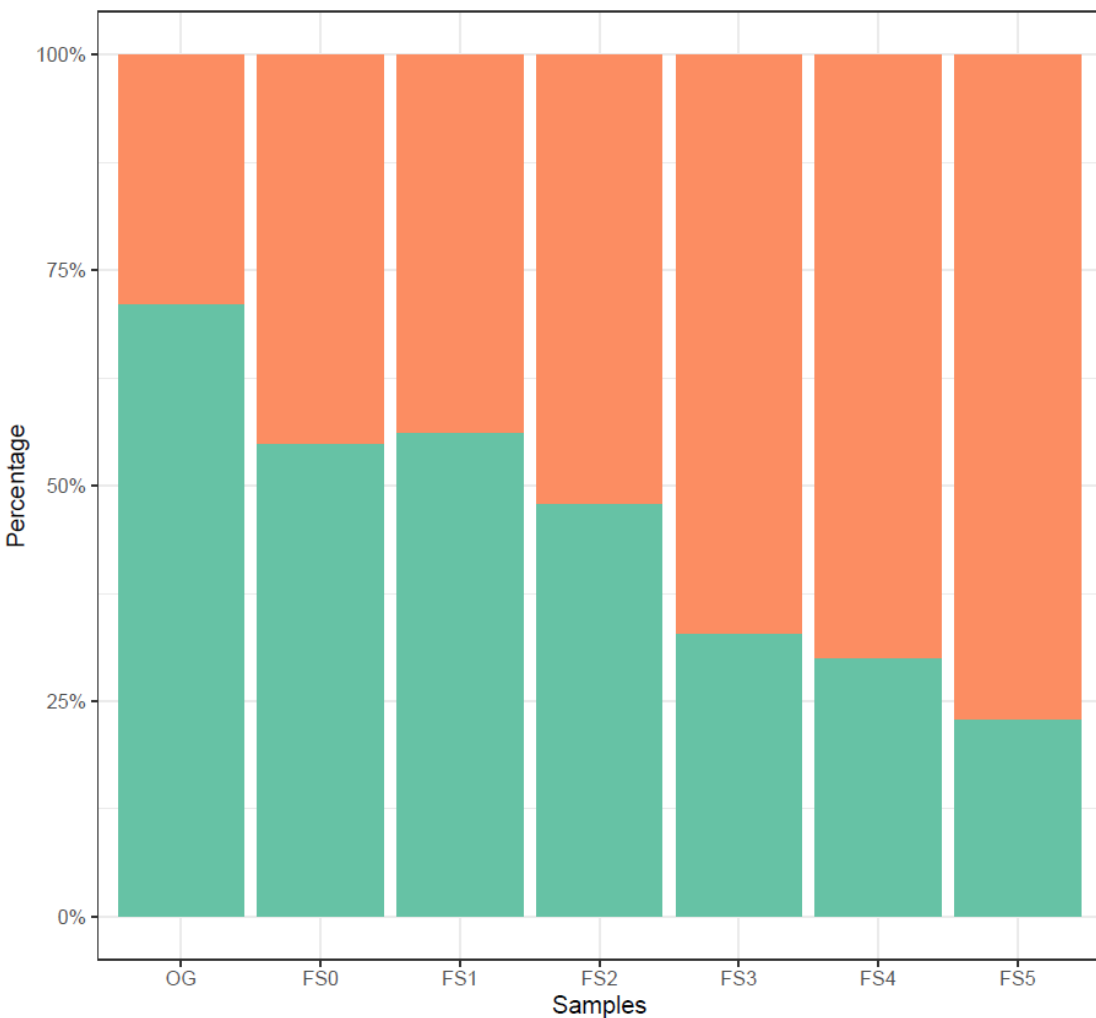
O Índice de Shannon é
usado para quantificar
biodiversidade específica.



Resultados



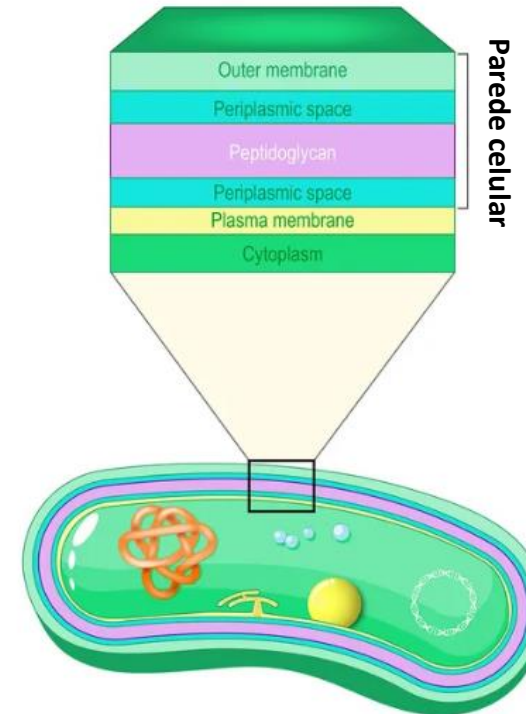
Análises exploratórias



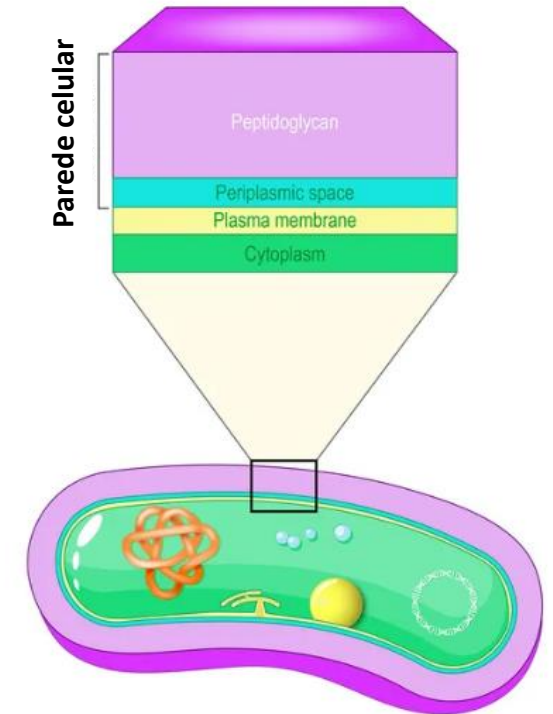
OG – Outgroup
FS – Score Peeira

gram-negative gram-positive

Bactéria gram-negativa



Bactéria gram-positiva



- As bactérias Gram-positivas são mais fáceis de matar devido a espessura da camada mais externa (peptidoglicano) a qual absorve facilmente antibióticos e produtos de limpeza.
- As várias camadas de parede celular nas bactérias gram-negativas oferecem-lhes resistência a essa intrusão.

Resultados



Diferenças de Abundância



Outgroup - OG

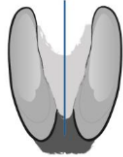
NÃO *D. nodosus*



NFIS

Amostras com sinais
leves de peeira

Score 0



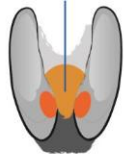
Score 1



FIS

Amostras com sinais
graves de peeira

Score 2



Score 3



Score 4



Comparações realizadas **estratégia 1**:

- OG vs **NFIS** ← 133/175
- OG vs **FIS** ← 172/219
- NFIS vs **FIS** ← 105/128
- OG vs. **(NFIS + FIS)** ← 146/186

Dichelobacter nodosus
Fusobacterium necrophorum
Treponema spp.

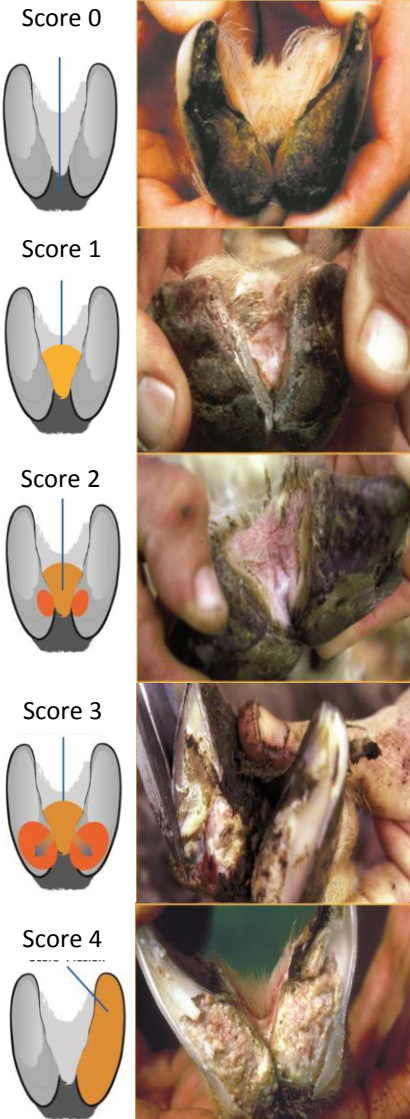
...

*Espécies conhecidas por causar
várias doenças nos pés de ovelhas*

Resultados



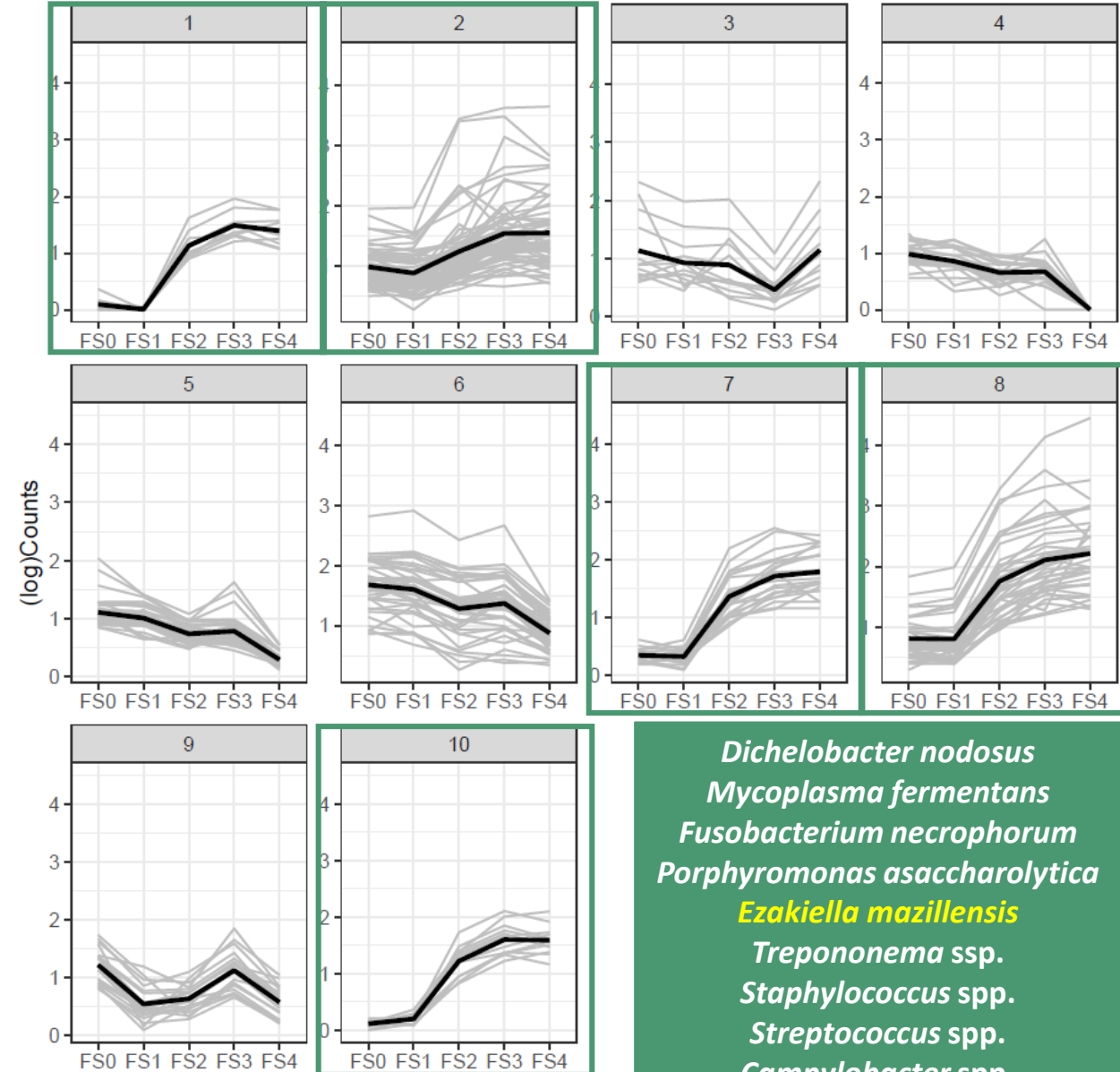
Diferenças de Abundância



Comparações realizadas estratégia 2:

- FS0 vs. FS1 **24**
- FS0 vs. FS2 **99**
- FS0 vs. FS3 **126**
- FS0 vs. FS4 **218**
- FS1 vs. FS2 **100**
- FS1 vs. FS3 **152**
- FS1 vs. FS4 **185**
- FS2 vs. FS3 **13**
- FS2 vs. FS4 **34**
- FS3 vs. FS4 **37**

Número total espécies: 281



Dichelobacter nodosus
Mycoplasma fermentans
Fusobacterium necrophorum
Porphyromonas asaccharolytica
Ezakiella mazillensis
Trepononema ssp.
Staphylococcus spp.
Streptococcus spp.
Campylobacter spp.

Conclusões



- ✓ Este foi o primeiro estudo de caracterização do microbioma da peeira utilizando as novas tecnologias de sequenciação aplicadas à metagenómica.
- ✓ Identificaram-se claras diferenças na composição do microbioma nos diferentes estados da doença.
- ✓ Identificaram-se um conjunto de espécies que proliferam à medida que a doença se agrava, sendo **espécies-chave** na diferenciação entre o estado leve e grave da doença.
- ✓ São necessárias análises adicionais sobre algumas espécies de *Campylobacter* e *E. massilensis*, bem como espécies com um perfil de proliferação semelhante, para entender melhor o papel que desempenham na peeira.

Agradecimentos



Ana Usié

Ref. ALT20-05-3559-FSE-000076

Ref. CEECINST/00100/2021

Entidades parceiras:



ACOS
AGRICULTORES
DO SUL



UNIVERSIDADE
DE ÉVORA



Instituto Nacional de
Investigação Agrária e
Veterinária, I.P.



DRAP Alentejo
Direção Regional de Agricultura e Pesca do Alentejo

GEN-RES
ALENTEJO

Gen-Res-Alentejo – Utilização de Genómica na Seleção de ovinos resistentes a Parasitas e Peera no Alentejo. Ref. ALT20-03-0145-FEDER-000037



Fundação
para a Ciência
e a Tecnologia

Ref. UIDB/05183/2020

Ref. CEECINST/00100/2021/CP2774/CT0001



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

RHAQ - Contratação de Recursos Humanos Altamente Qualificados (PME ou CoLAB) Ref. ALT20-05-3559-FSE-000076

Entidades promotoras:



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Social Europeu

