

The microbiota of hematophagous ectoparasites collected from migratory birds in Italy

Cerutti F, Modesto P, Rizzo F, Cravero A, Jurman I, Costa S, Giammarino M, Mandola ML, Gorla M,
Radovic S, Cattonaro F, Acutis PL, Peletto S

IV Congresso Nazionale di Ecopatologia della Fauna
Domodossola (VB) – 11-13 Ottobre 2017

Introduzione

Gli uccelli selvatici possono diffondere patogeni in 3 modi:

*Carrier biologici:
il patogeno si replica nell'ospite*



*Carrier meccanici:
il patogeno è trasportato meccanicamente*

Carrier di ectoparassiti ematofagi infetti:

- *Trasmissione ad altro ospite*
- *Trasmissione per co-feeding*

Obiettivi

Approccio innovativo per lo studio della biodiversità microbica degli ectoparassiti degli uccelli migratori tramite tecnologia NGS

NGS: *Next Generation Sequencing*, innovativo metodo di sequenziamento ad alto rendimento per generare miliardi di sequenze in poco tempo

Metabarcoding 16S per l'identificazione di sequenze di agenti infettivi negli ectoparassiti degli uccelli migratori

Metabarcoding: sequenziamento di un breve frammento di DNA e classificazione degli organismi presenti nel campione

Caratterizzare il microbiota degli ectoparassiti rilevati su uccelli migratori catturati in Italia

Microbiota: insieme dei microorganismi presenti in un ambiente

Indagare la presenza sul territorio campionato di agenti infettanti esotici o nuovi importati attraverso gli ectoparassiti degli uccelli migratori e non

Materiali e metodi

28 specie di uccelli campionati (migratori a lungo raggio, a breve raggio, stanziali) durante sessioni di inanellamento



Raccolta di 194 ectoparassiti da 115 individui, suddivisi in 120 pool in base a ospite, data e sito (116 effettivamente analizzati)



- 1) Ditteri*
- 2) Zecche*
- 3) Altri ectoparassiti*



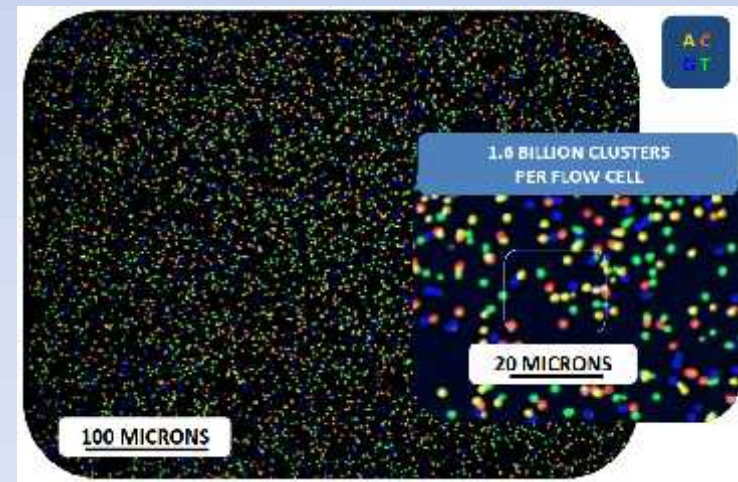
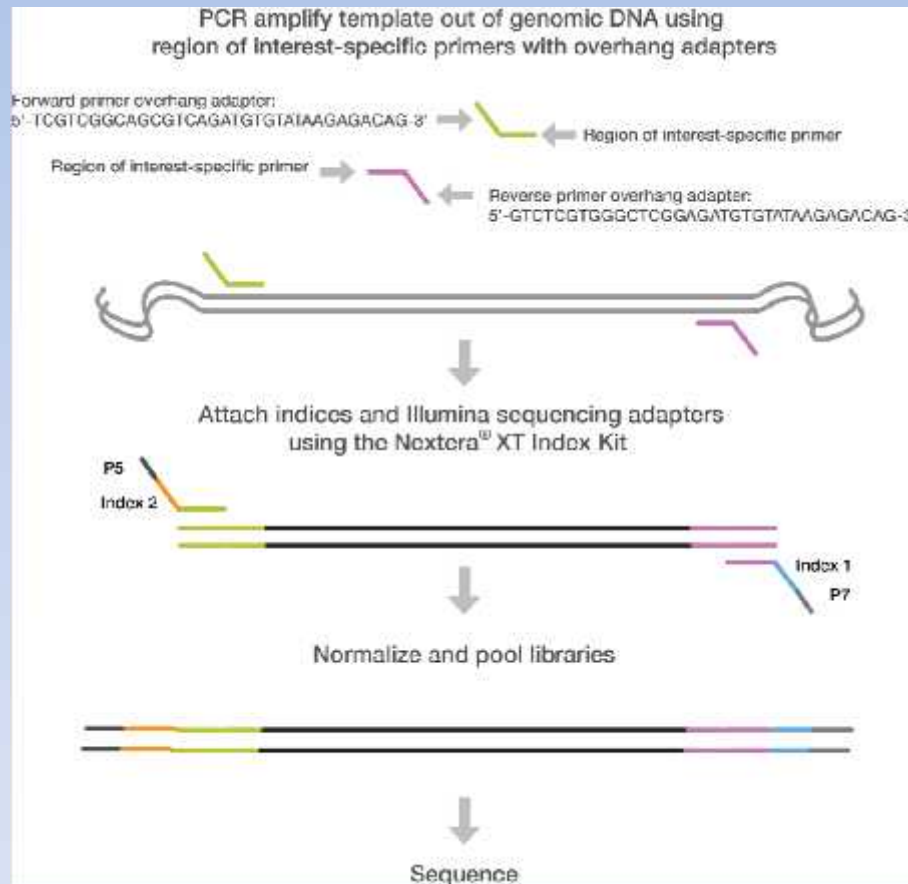
Materiali e metodi

Siti di campionamento



Materiali e metodi

Metabarcoding del gene 16S rRNA



Materiali e metodi

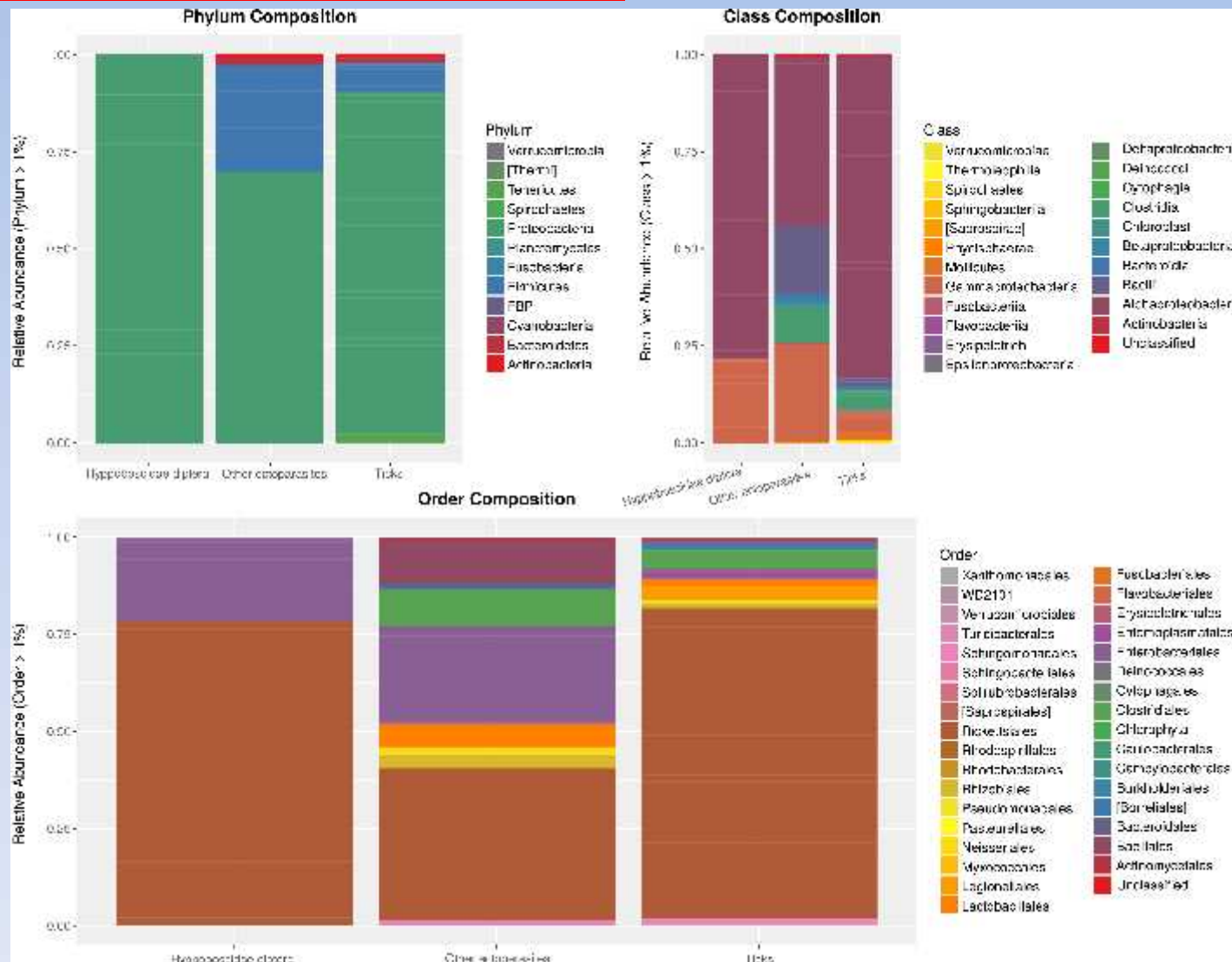
*Amplificazione e sequenziamento del gene 16S
dell'RNA ribosomiale secondo protocollo Illumina
(regioni V3-V4 del 16S)*

*Analisi dati metabarcoding con MiSeq Reporter
Metagenomics Workflow e QIIME*

*Conferma delle infezioni rilevate
mediante PCR*

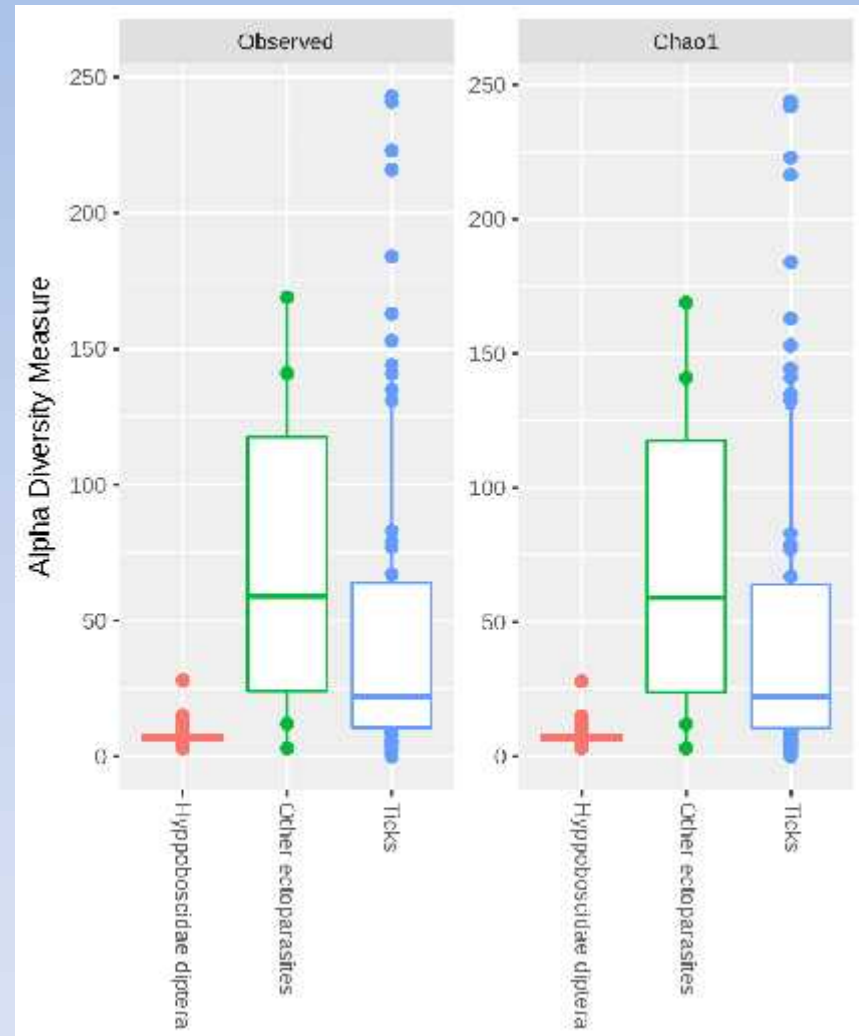
Risultati

Composizione del microbiota suddiviso per phylum, classe e ordine per i gruppi di parassiti



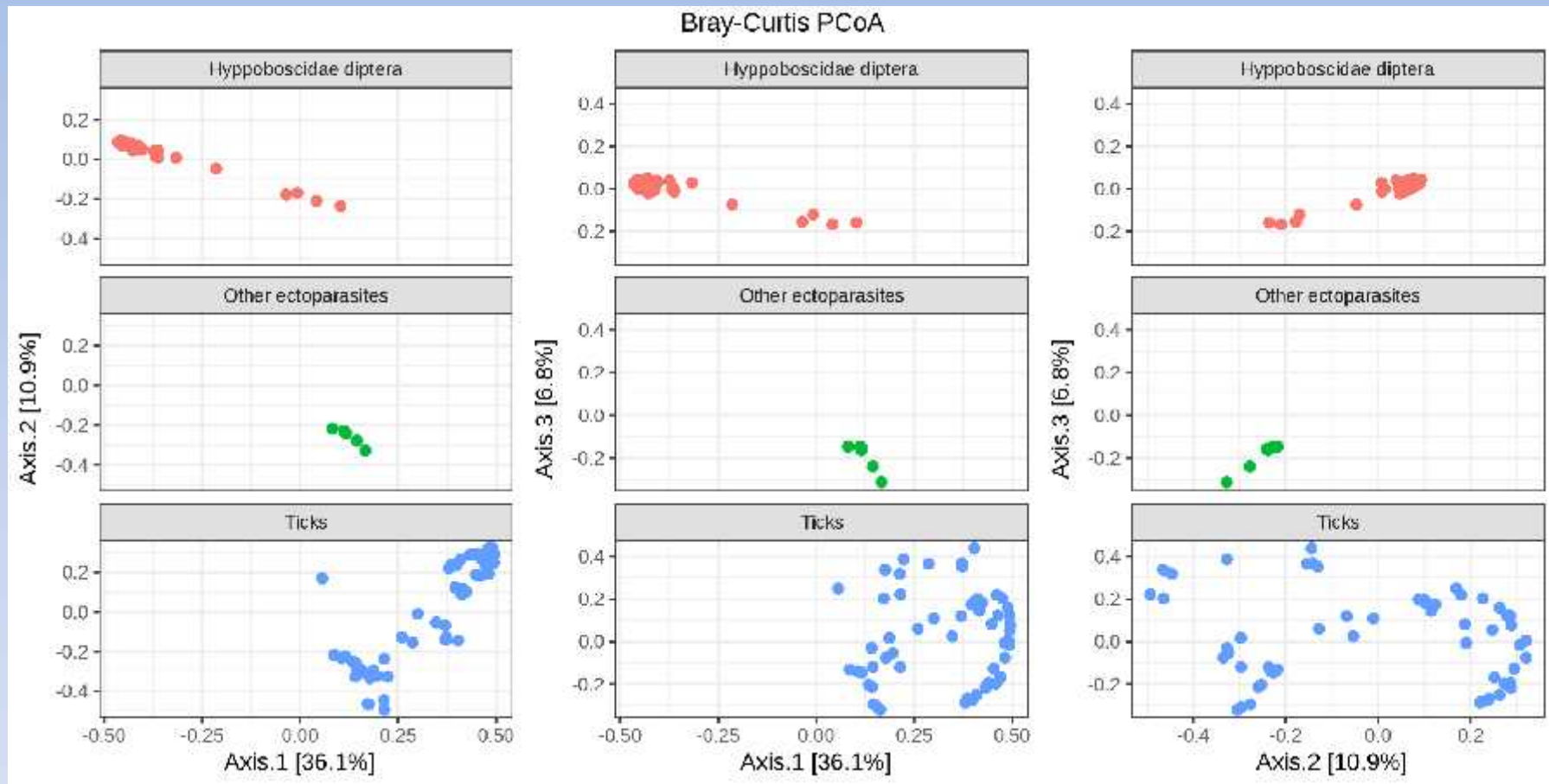
Risultati

Alpha diversity



Risultati

Beta diversity



Principal components analysis basata sulle distanze di
Bray-Curtis per i tre gruppi separati.
L'asse 1 descrive il 36.1% della variabilità nei campioni

Risultati

I generi potenzialmente zoonosici riscontrati

Genere	MSR Hits	MSR Prevalenza
<i>Rickettsia</i>	110	94.8%
<i>Ehrlichia</i>	98	84.5%
<i>Borrelia</i>	17	14.7%
<i>Coxiella</i>	6	5.2%
<i>Francisella</i>	4	3.4%
<i>Bartonella</i>	4	3.4%
<i>Anaplasma</i>	3	2.6%

In zecche

Rickettsia 60,32% (IC al 95%: 47,98-71,47)

Borrelia 15,87% (IC al 95%: 8,86-26,81)

Risultati

I generi potenzialmente zoonosici riscontrati

Genere	MSR Hits	MSR Prevalenza	Conferme PCR	Prevalenza PCR
Rickettsia	110	94.8%	47	40.5%
Ehrlichia	98	84.5%	-	-
Borrelia	17	14.7%	10	8.6%
Coxiella	6	5.2%	0	0.0%
Francisella	4	3.4%	2	1.7%
Bartonella	4	3.4%	0	0.0%
Anaplasma	3	2.6%	2	1.7%

Simbionte *Rickettsia*-like?

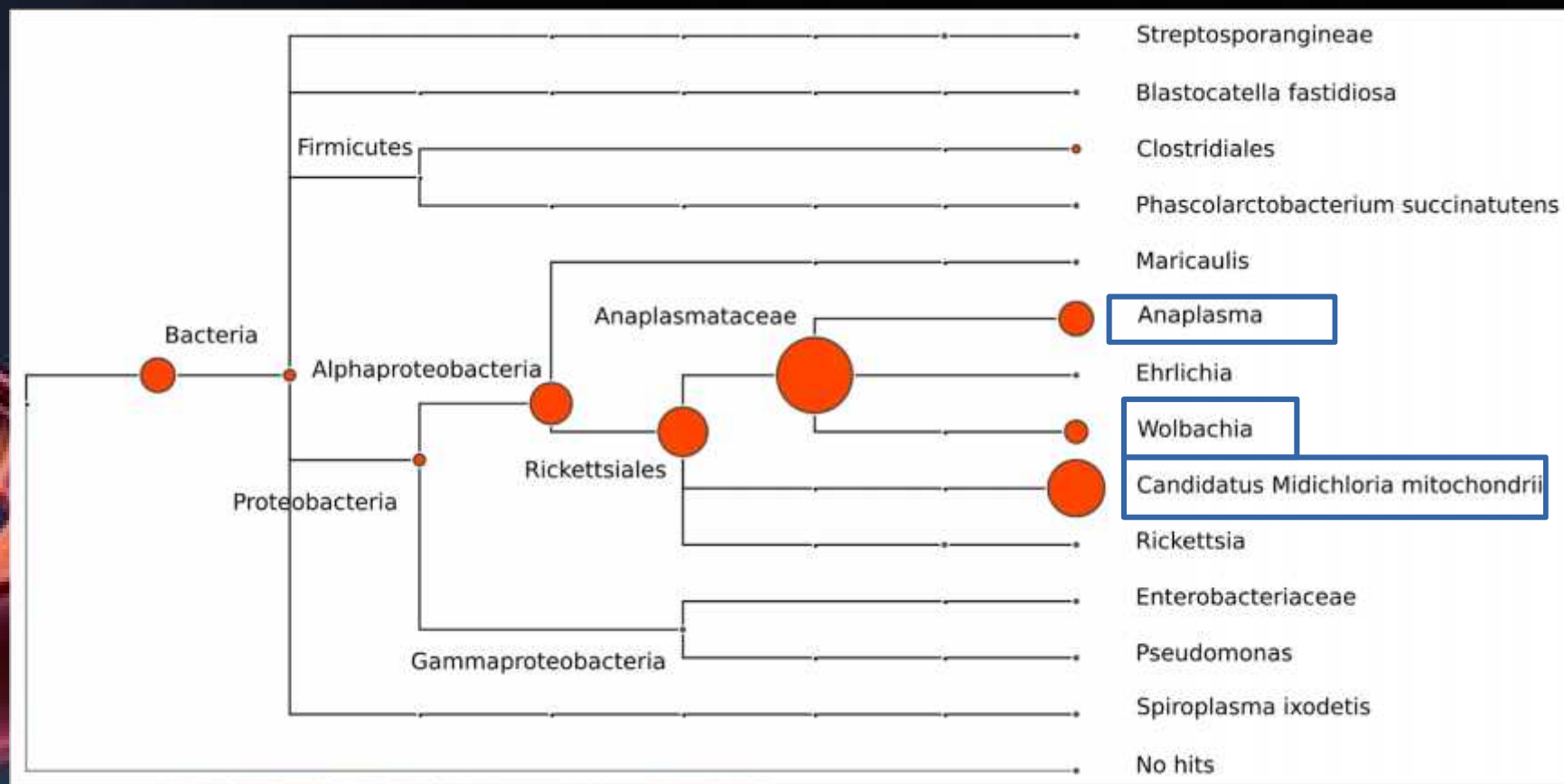
Errore di identificazione?

Simbionte *Coxiella*-like?

Simbionte *Francisella*-like

Risultati

Risultati di Blast-Megan di un campione con *E. ovina*



Risultati

Specie confermate mediante PCR e sequenziamento Sanger:

Rickettsia aeschlimanii, R. helvetica, R. monacensis

Anaplasma phagocytophilum

Borrelia valaisiana

Coinfezioni confermate:

Borrelia-Rickettsia (n=9)

Anaplasma-Rickettsia (n=2)

I generi di simbionti riscontrati:

Wolbachia, Arsenophonus,

Candidatus Midichloria

mitochondrii, Francisella-like

Discussione

NGS sembra identificare un maggior numero di positività rispetto a PCR/Sanger

C'è il problema dei simbionti

- E. ovina o C. Midichloria mitochondrii?*
 - Risultati diversi dovuti ai diversi database*
 - Pochi dati in letteratura di E. ovina*
 - Difficoltà di discriminare simbionti/patogeni*
-

Ringraziamenti



Simone Peletto
Francesco Cerutti
Pier Luigi Acutis
Paola Modesto
Maria Lucia Mandola
Francesca Rizzo
Mariella Gorla
Alessandra Cravero
Riccardo Orusa



Federica Cattonaro
Giorgia Dubsky de
Wittenau
Irena Jurman
Vera Vendramin
Slobodanka Radovic

Laboratorio Chimico della Camera di Commercio - Torino

Piergiovanni Piatti
Stefano Costa

IZS AM

Giovanni Savini

IZS Sicilia

Santo Caracappa

E a Voi per l'attenzione



Ricerca Corrente 2012
Progetto **IZS PLV 16/12 RC**
Resp. scientifico: **Simone Peletto**