

Le miasi da Oestridae: diagnosi sierologica e molecolare

D. Otranto¹, D. Traversa², A. Giangaspero³

¹Dipartimento di Sanità e Benessere Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari; ²Dipartimento di Scienze Biomediche Comparate, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo; ³Dipartimento PR.I.M.E., Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Foggia.

Abstract [Serological and molecular approaches to the diagnosis of myiasis causing Oestridae]. Myiasis causing Oestridae (bot flies) infect several animal species world-wide, from palaeartic to subtropical/tropical areas. Oestrids affect livestock production causing abortion, reduced milk production, losses in weight and fertility, poor hide quality and an impairment of the host's immune system. In the last few years much research has been carried out on the immunology of these infestations, in order to acquire efficient and reliable diagnostic serological tools; the genome of the different species of Oestridae has been studied to further their molecular identification, taxonomy and phylogenesis. The immunodiagnostic methods for many myiasis causing Oestrids have proven to be a viable alternative to the clinical parasitological examination or the post-mortem examination. Numerous serological tests have been developed for the diagnosis of bovine hypodermosis caused by *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*, and ELISAs using larval hypodermin C as the antigen are currently used on serum, individual and pooled milk samples to detect the presence of circulating anti-*Hypoderma* antibodies. In Italy the best period to sample the animals is November-January, since it is in this period that the antibody kinetics of the animals reaches a peak. Recently the efficacy of the ELISA test on pasteurized milk samples has been demonstrated, allowing the diagnosis of bovine hypodermosis also in areas where there is no information on the presence of the disease and the sampling of the animals is laborious. The cross-reactivity between *Przhevalskiana silenus* antigens and anti-*Hypoderma* antibodies led to assessing the usefulness of a simple and cost-effective ELISA for the diagnosis of goat warble fly infection. In particular, it has been demonstrated that infected goats display an antibody peak in November-December in blood and milk, thus making this period suitable for sampling. Although no extensive data is available on the immunology of sheep and goat oestrosis caused by *Oestrus ovis*, the efficacy of ELISA has been demonstrated by correlating serological results with clinical post-mortem examinations. No immunological techniques are currently used to diagnose gasterophilosis of equids and only one study reports the efficacy of ELISA for detecting anti-*Gasterophilus* antibodies in infected equids. Several studies have been conducted into the molecular characterization of the mitochondrial DNA (mtDNA) - in particular of the gene encoding for the cytochrome oxidase I (COI)- for many free-living and parasitic arthropods for diagnostic, taxonomic and phylogenetic purposes. As regards Oestridae causing myiasis, the first study features a PCR-RFLP assay of the most common Italian species (i.e. *H. bovis*, *H. lineatum*, *Gasterophilus intestinalis*, *P. silenus*, *O. ovis*), which showed clear genetic differences among the genera examined, but no inter-specific variation between the two species of *Hypoderma* considered. The molecular characterization of the most variable region of the COI gene (encoding for the region from E4 to the terminal COOH) was able to clearly differentiate *H. bovis* and *H. lineatum*. The E4-COOH region of the COI gene has been characterized for 18 oestrid species and from a taxonomical point of view, molecular data confirm the morphological classification, with the examined species divided into four sub-families. New insights have also been gained on the molecular differentiation of the most common species of *Hypoderma* (i.e. *H. bovis*, *H. lineatum*, *Hypoderma actaeon*, *Hypoderma diana* and *Hypoderma tarandi*) and, in particular, the restriction enzyme *Bfal*, provides a diagnostic profile that can be used to simultaneously differentiate all the species examined. The characterization of the E4-COOH COI gene and the hyper-variable region of the gene encoding for the ribosomal *lsu* revealed the identity of *Hypoderma sinense* as a new species, infecting cattle and yaks in China. Finally, the molecular analysis of the same mitochondrial and ribosomal regions showed that *P. silenus*, *Przhevalskiana aegagri* e *Przhevalskiana crossii* are morphotypes of the same species.

Nell'ambito delle infestazioni da ectoparassiti degli animali da reddito, le miasi hanno diffusione cosmopolita e inducono gravi perdite economiche a carico delle produzioni zootecniche (calo della fertilità, aborti, riduzione della produzione di latte, decremento ponderale e lesioni alle pelli) (Hall e Wall, 1995). Le larve appartenenti alla famiglia Oestridae causano miasi obbligatorie a carico di diversi distretti anatomici dell'ospite parassitato: vie nasofaringee (*Oestrus*, *Rhinoestrus*, *Cephalopina*), apparato gastroenterico

(*Gasterophilus*), organi interni e/o sottocute (*Hypoderma*, *Przhevalskiana*). Queste larve causano gravi infestazioni e, poiché il periodo di tempo in cui esse stimolano il sistema immunitario è molto lungo (da alcune settimane a molti mesi) la risposta immunitaria dell'ospite è intensa. Negli ultimi anni particolare attenzione è stata rivolta sia all'immunologia delle miasi, al fine di mettere a punto test diagnostici sensibili e specifici, sia allo studio del genoma delle diverse specie, per l'identificazione molecolare e per studi tassonomici e filogenetici.

Sierologia

La risposta immunitaria dell'ospite, aspecifica e specifica, nei confronti delle larve agenti di miasi è strettamente correlata allo stato di salute dell'animale e alla biologia, alla localizzazione e alla natura degli antigeni del parassita. Il corretto impiego delle metodiche sierologiche per la diagnosi di una miasi non può, pertanto, prescindere da un'adeguata e profonda conoscenza della risposta immunitaria degli animali infestati. La sierodiagnosi delle miasi è una valida alternativa sia all'esame clinico parassitologico sia alla diagnosi *post-mortem* e permette di effettuare diagnosi negli animali in vita, con costi limitati, quando le larve sono ancora in fase di migrazione o comunque non individuabili nel corpo dell'ospite. Una diagnosi precoce permette inoltre di intervenire con trattamenti farmacologici nelle prime fasi di sviluppo delle larve, quando esse non hanno ancora causato lesioni gravi agli animali. Numerose ricerche condotte in bovini infestati naturalmente e sperimentalmente con larve di *Hypoderma* hanno dimostrato l'esistenza sia di una risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata sia di complesse interazioni esistenti tra il sistema immunitario dell'animale e il parassita. In particolare, nel corso della prima infestazione, le larve di primo stadio (L1) producono tripsine e chimo-tripsine in grado di inibire il sistema immunitario dell'animale bloccando la risposta aspecifica e specifica (Boulard, 1985; Baron e Colwell DD, 1991; Boulard, 1989). Nelle infestazioni successive, le IgG anti-*Hypoderma* compaiono entro 1-2 mesi *post-infestazione* (p.i.), raggiungono la concentrazione massima dopo circa 16-20 settimane p.i. e decrescono quando le larve sono ormai nel sottocute del dorso (Boulard *et al.*, 1996). Pur non essendo il titolo anticorpale correlato alla protezione nei confronti di *Hypoderma*, esso è fondamentale per conseguire una diagnosi precoce dell'infestazione. Infatti nei bovini infestati, gli anticorpi anti-*Hypoderma* persistono per 3-4 mesi dopo la fuoriuscita delle larve di terzo stadio (L3) dai noduli presenti sul dorso degli animali e raggiungono il picco massimo tra novembre e marzo (mesi ideali per il prelievo dei campioni di sangue da utilizzare per la diagnosi precoce dell'ipodermosi). La sierodiagnosi dell'ipodermosi, mediante metodica ELISA, utilizza come antigene l'ipodermina C (HC), collagenasi estratta dalle L1 di *H. lineatum* e può essere effettuata non solo su campioni di sangue, ma anche su campioni individuali di latte e sul latte di stalla, in quanto nel latte si rileva una cinetica anticorpale sovrapponibile a quella del sangue (Boulard e Villejoubert, 1991; Boulard *et al.*, 1996). Recentemente è stata dimostrata l'efficacia della forma enzimaticamente attiva dell'HC ricombinante, ottenuta con l'ingegneria genetica, nell'aumentare la sensibilità della metodica ELISA (Boldbaatar *et al.*, 2001). E' stata anche messa a punto una metodica ELISA (*Ag-capturing* ELISA) che consente di individuare l'HC circolante a partire dalla sesta settimana p.i. (Panadero *et al.*, 2002; Colwell *et al.*, 2003). In Italia sono state condotte numerose ricerche per

valutare l'efficacia dei test sierologici per la diagnosi dell'ipodermosi. In particolare è stata studiata la cinetica anticorpale di bovini naturalmente infestati ed è stato dimostrato che il periodo migliore per il prelievo di sangue o di campioni di latte per effettuare una diagnosi epidemiologica nelle regioni meridionali è novembre-gennaio (Caringella *et al.*, 1994; Santagada *et al.*, 2002). Recentemente è stata inoltre dimostrata l'efficacia del test ELISA anche impiegando campioni di latte del commercio pastorizzato; il test consente di effettuare una diagnosi di ipodermosi in modo semplice, veloce ed economico, soprattutto nelle aree geografiche in cui non sono disponibili informazioni sulla presenza della malattia e non è facile il campionamento dei singoli animali (Otranto *et al.*, 2001). Nonostante non siano disponibili informazioni dettagliate sull'immunologia della miasi sottocutanea delle capre causata da *Przhevalskiana silenus*, le similitudini antigeniche tra l'HC di *Hypoderma* e alcuni antigeni di *P. silenus* hanno permesso di allestire metodiche sierodiagnostiche, semplici ed economiche, per la diagnosi di questa infestazione. Infatti è disponibile un test ELISA che, sfruttando la cross-reattività esistente fra gli antigeni di *H. lineatum* e gli anticorpi anti-*P. silenus*, consente, a partire da campioni di sangue e latte, di conseguire diagnosi di miasi sottocutanea dei caprini molto precocemente, nel periodo novembre-dicembre (Otranto *et al.*, 1998; Otranto *et al.*, 1999).

Estrosi degli ovini e dei caprini

Per quanto riguarda la miasi nasale degli ovini e dei caprini causata da *Oestrus ovis*, la stimolazione del sistema immunitario è dovuta soprattutto ai polipeptidi prodotti dalle ghiandole salivari delle larve piuttosto che agli antigeni cuticolari. La risposta immunitaria umorale dell'animale, legata alla produzione di IgG, è strettamente condizionata dal numero delle larve presenti e alla loro sopravvivenza nell'ospite, in quanto è stato dimostrato che negli animali giovani si rileva una maggiore prevalenza dell'infestazione (Van Khanh *et al.*, 1999). Contrariamente a quanto dimostrato per le miasi causate da *Hypoderma* e da *Przhevalskiana*, non esistono tecniche sierologiche utilizzate correntemente per la diagnosi di estrosi. Tuttavia, mettendo in correlazione i risultati sierologici con i rilievi *post-mortem*, è stata dimostrata l'attendibilità di un test ELISA che utilizza antigeni somatici crudi estratti da L1 di *O. ovis* (Goddard *et al.*, 1999).

Gasterofilosi ed estrosi degli equini

Le informazioni relative alle reazioni immunitarie dei cavalli parassitati da *Gasterophilus* e *Rhinoestrus* sono molto limitate. L'efficacia della sierodiagnosi dell'infestazione da *Gasterophilus* in animali naturalmente infestati è attualmente in fase di studio e i risultati ottenuti sono da considerare preliminari (Escartin-Pena e Bautista Garfias, 1993), mentre non sono state mai sperimentate tecniche sierologiche per la diagnosi dell'infestazione da *Rhinoestrus*.

La biologia molecolare applicata allo studio delle miasi

Negli ultimi anni la tassonomia, la filogenesi, la diagnosi e la terapia di molte importanti malattie parassitarie di interesse umano e veterinario sono state studiate mediante le tecniche di biologia molecolare. Per quanto riguarda gli artropodi sono state condotte molte ricerche sul DNA mitocondriale di insetti e aracnidi sia a vita libera sia parassiti e tra i diversi geni, quello che codifica per la subunità I della citocromossidasi (COI) è stato caratterizzato sia per studi tassonomici ed evolutivisti sia per l'identificazione molecolare dei parassiti (Lunt *et al.*, 1996; Zhang e Hewitt, 1996).

Per quanto riguarda le mosche agenti di miasi sono state condotte numerose ricerche per l'identificazione di stadi maturi e immaturi di specie appartenenti alle famiglie Sarcophagidae e Calliphoridae, particolarmente nell'ambito dell'entomologia forense (Stevens e Wall, 2001; Wells e Sperling, 2001; Wells *et al.*, 2001); gli studi molecolari condotti invece sulle larve appartenenti alla famiglia Oestridae sono molto limitati.

Il primo studio è stato avviato mettendo a punto una PCR-RFLP che ha consentito l'identificazione molecolare, a livello di genere, delle 5 specie di Oestridae più comuni in Italia (*H. bovis*, *H. lineatum*, *P. silenus*, *O. ovis*, *Gasterophilus intestinalis*), ma non di distinguere le due specie di *Hypoderma* che parassitano i bovini (Otranto *et al.*, 2000). Successivamente, il tratto più variabile del gene della COI di *H. bovis* e *H. lineatum* è stato caratterizzato e sulla base delle differenze interspecifiche è stata messa a punto un'analisi di restrizione che ha consentito di distinguere le due specie (Otranto *et al.*, 2003a). Nell'ambito di questo filone di ricerca è stato recentemente intrapreso uno studio più ampio, che ha riguardato la caratterizzazione della regione più variabile del gene della COI di 18 specie di Oestridae, appartenenti alle 4 sottofamiglie (Cuterebrinae, Gasterophilinae, Hypodermatinae, Oestrinae). La regione esaminata, compresa fra l'elica transmembrana esterna 4 (E4) e il terminale carbossilico (COOH), è caratterizzata da elevati valori di differenze interspecifiche a fronte di scarse differenze intraspecifiche, ed è pertanto molto utile per risolvere problemi tassonomici e filogenetici e per l'identificazione molecolare a livello di specie (Otranto *et al.*, 2003b). Per quanto riguarda gli aspetti filogenetici questo studio ha dimostrato che le Oestridae sono suddivise in quattro genogruppi, perfettamente corrispondenti alle 4 sottofamiglie, in accordo con la classificazione classica basata su caratteri morfologici e biologici. In prospettiva, questi risultati sono molto importanti sia per chiarire l'evoluzione delle Oestridae all'interno della superfamiglia Oestroidea e i rapporti filogenetici con le famiglie Calliphoridae e Sarcophagidae, sia per comprendere meglio l'origine del parassitismo esercitato dalle larve di questi ditteri.

Per quanto riguarda invece le applicazioni diagnostiche, le caratteristiche nucleotidiche della regione iper-

variabile del gene codificante per la COI, e le relative informazioni sulla sequenza, forniscono un dataset molto utile sia per l'identificazione molecolare di alcune specie sia per risolvere problemi tassonomici. Ad esempio, la metodica per differenziare *H. bovis* e *H. lineatum* è stata estesa anche ad altre tre specie di *Hypoderma* che infestano i ruminanti selvatici, *Hypoderma actaeon*, *Hypoderma diana* e *Hypoderma tarandi*. Le cinque specie di *Hypoderma* sono state differenziate simultaneamente tra loro mediante PCR-RFLP della regione ipervariabile del gene della COI e l'approccio molecolare è stato integrato con la descrizione morfologica delle L3 mediante osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM). In particolare è stato dimostrato che l'endonucleasi *Bfal* è in grado di differenziare contemporaneamente, identificandole, tutte le cinque specie di *Hypoderma* esaminate (Otranto *et al.*, 2003c).

Le ricerche sui geni delle Oestridae hanno recentemente permesso di giungere ad importanti risultati tassonomici e, in particolare, allo studio del gene della COI è stato affiancata anche la caratterizzazione della regione ipervariabile delle prime 0.8Kb del gene nucleare codificante per la subunità 28S dell'RNA ribosomiale (rRNA). La caratterizzazione di queste regioni genomiche ha permesso di rilevare l'esistenza di un'altra specie di *Hypoderma*, *Hypoderma sinense*, specie mai descritta morfologicamente in precedenza ma solo tradizionalmente nota con questo nome nei paesi asiatici e responsabile dell'ipodermosi nei bovini e negli yaks in Cina. Questa specie si differenzia da *H. bovis* e *H. lineatum*, oltre che morfologicamente, anche genotipicamente, in quanto sono state messe in evidenza elevate differenze nucleotidiche nelle regioni esaminate rispetto alle altre due specie che infestano comunemente i bovini. Tali risultati consentiranno di chiarire il ciclo endogeno di *H. sinense*, tuttora sconosciuto e offrono importanti prospettive per chiarire l'eziologia dell'ipodermosi umana, che presenta prevalenze elevate in Cina (Otranto *et al.*, 2004). Recentemente un altro dubbio tassonomico è stato risolto mediante lo studio delle stesse regioni geniche, dimostrando che *P. silenus*, *Przhevalskiana aegagri* e *Przhevalskiana crossii*, causa della miasi sottocutanea delle capre, sono morfotipi di una stessa specie. In particolare *P. silenus*, *P. aegagri* e *P. crossii* erano ritenute in passato tre specie distinte sulla base di leggere differenze morfologiche esistenti tra gli stadi larvali. La mancanza di differenze nucleotidiche tra le regioni ipervariabili dei geni codificanti per la COI e il 28S rRNA di larve identificate morfologicamente come appartenenti a questi tre ipotetici taxa, ha confermato che *P. silenus*, *P. aegagri* e *P. crossii* sono morfotipi della stessa specie (Otranto e Traversa, 2004).

Riferimenti bibliografici

- Baron RW, Colwell DD (1991). Enhanced resistance to cattle grub infestation (*Hypoderma lineatum* de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoryl lipid A (MPL). *Vet Parasitol* 38: 185-197.

- Boldbaatar D, Xuan X, Kimbita E, Huang X, Igarashi I, Byambaa B, Battsetseg B, Battur B, Battsetseg G, Batsukh Z, Nagasawa H, Fujisaki K, Mikami T (2001). Detection of antibodies to *Hypoderma lineatum* in cattle by Western blotting with recombinant hypodermin C antigen. *Vet Parasitol* 99: 147-154.
- Boulard C (1985). Advantages of the immunodiagnosis of bovine hypodermosis established by passive hemagglutination and by ELISA, using serum and lactoserum, over the warble count. *Ann Rech Vet* 16: 335-343.
- Boulard C (1989). Degradation of bovine C3 by serine proteases from parasites *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae). *Vet Immunol Immunopathol* 20: 387-398.
- Boulard C, Villejoubert C (1991). Use of pooled serum or milk samples for the epidemiological surveillance of bovine hypodermosis. *Vet Parasitol*, 39: 171-183.
- Boulard C, Villejoubert C, Moire N, Losson B, Lonneux JF (1996). Sero-surveillance of hypodermosis in a herd under therapeutic control. Effect of a low level of infestation. *Vet Parasitol* 66: 109-117.
- Caringella MP, Giangaspero A, Puccini V (1994). Individual kinetic development of anti-*Hypoderma* spp. antibodies in naturally infested cattle. *Parassitologia* 36: 29.
- Colwell DD, Panadero-Fontan R, Lopez-Sandez C, Parra-Fernandez F, Paz-Silva A, Sanchez-Andrade R, Diez-Banos P (2003). Effect of treatment on the dynamics of circulating hypodermin C in cattle naturally infested with *Hypoderma lineatum* (Diptera: Oestridae). *Vet Parasitol* 113: 263-272.
- Escartin-Pena M, Bautista Garfias CR (1993). Comparison of five tests for the serologic diagnosis of myiasis by *Gasterophilus* spp. larvae (Diptera: Gasterophilidae) in horses and donkeys: a preliminary study. *Med Vet Entomol* 7: 233-237.
- Goddard P, Bates P, Webster KA (1999). Evaluation of a direct ELISA for the serodiagnosis of *Oestrus ovis* infections in sheep. *Vet Rec* 144: 497-501.
- Hall M, Wall R (1995). Myiasis of humans and domestic animals. *Adv Parasitol* 35: 257-334.
- Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Ins Mol Biol* 5: 153-165.
- Otranto D, Giangaspero A, Caringella MP, Puccini V (1998). *Hypoderma lineatum* antigen and anti-*Przhevalskiana silenus* antibodies: cross reactivity and antibody kinetics in naturally infested goats. *Parassitologia* 40: 325-331.
- Otranto D, Boulard C, Giangaspero A, Caringella MP, Rimmele D, Puccini V (1999). Serodiagnosis of goat warble fly infestation by *Przhevalskiana silenus* with a commercial ELISA kit. *Vet Rec* 144: 726-729.
- Otranto D, Tarsitano E, Giangaspero A, Puccini V (2000). Differentiation by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism of some Oestridae larvae causing myiasis. *Vet Parasitol* 90: 305-313.
- Otranto D, Testini G, Sottili R, Capelli G, Puccini V (2001). Screening of commercial milk samples using ELISA for immuno-epidemiological evidence of infection by the cattle grub (Diptera: Oestridae). *Vet Parasitol* 99: 241-248.
- Otranto D, Traversa D, Tarsitano E, Stevens J. (2003a). Molecular differentiation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum* (Diptera, Oestridae) by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). *Vet Parasitol* 112: 197-201.
- Otranto D, Traversa D, Guida B, Tarsitano E, Fiorente P, Stevens JR (2003b). Molecular characterization of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase I gene of Oestridae larvae causing obligate myiasis. *Med Vet Entomol* 17: 307-315.
- Otranto D, Colwell DD, Traversa D, Stevens JR (2003c). Species identification of *Hypoderma* affecting domestic and wild ruminants by morphological and molecular characterization. *Med Vet Entomol* 17: 316-325.
- Otranto D, Traversa D (2004). Molecular evidence indicating that *Przhevalskiana silenus*, *Przhevalskiana aegagri* and *Przhevalskiana crossii* (Diptera, Oestridae) are one species. *Acta Parasitol*. In corso di stampa.
- Otranto D, Traversa D, Colwell DD, Guan G, Giangaspero A, Boulard C, Yin H (2004). A third species of *Hypoderma* (Diptera, Oestridae) affecting cattle and yaks in China: molecular and morphological evidence. *J Parasitol*. In corso di stampa.
- Panadero-Fontan R, Lopez-Sandez C, Parra-Fernandez F, Morrondo-Pelayo P, Diez-Banos P, Colwell DD (2002). Detection of circulating hypodermin C: an antigen capture ELISA for diagnosis of cattle grub (Diptera: Oestridae) infestations. *Vet Parasitol* 108: 85-94.
- Santagada G, Otranto D, Traversa D, Faliero SM, Puccini V (2001). Comparative study of anti-*Hypoderma* antibody kinetics in sera, single and bulk milk samples of naturally infested cattle. *Parassitologia* 43 (3): 109-111.
- Stevens JR, Wall R (2001). Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *For Sci Int* 120: 116-123.
- Van Khanh N, Jacquet P, Duranton C, Bergeaud JO, Preuot F e Dorchies P (1999). Réactions cellulaires des muqueuses nasales et sinusales des chèvres et des moutons a l' infestation naturelle par *Oestrus ovis* Linne 1758 (Diptera: Oestrides). *Parasite* 2: 141-149.
- Wells JD, Pape T, Sperling FAH (2001). DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *J For Sci* 46: 1098-1102.
- Wells JD, Sperling FAH (2001). DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *For Sci Int* 120: 110-115.
- Zhang DX, Hewitt GM (1996). Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Ins Mol Biol* 6: 143-150.