

DERMANYSSUS GALLINAE TRASMETTE VERTICALMENTE SALMONELLA GALLINARUM: PRIMA DIMOSTRAZIONE IN VITRO

Schiavone A., Pugliese N., Samarelli R., Circella E., D'Amico F., Camarda A.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S.P. per Casamassima km 3, 70010 Valenzano (BA), Italia

Summary

This study is aimed to evaluate the vertical transmission of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (S.) ser. Gallinarum, the etiological agent of Fowl Typhoid (FT), by *Dermanyssus gallinae*. The investigation was carried out on mite samples fed *in vitro* on blood artificially infected with *S. Gallinarum*, by adopting feeding devices constructed with a Baudruche membrane. The engorged mites were incubated individually for 72 and 120 hours. The DNA was extracted from eggs and pools of adults and larvae, after 72 hours, and from pools of protonymphs, after 120 hours. A real time PCR was performed to assess and quantify *S. Gallinarum* in mites. All adults, 7,7% of eggs, 12,5% of larvae and 66,7% of protonymphs were positive to *S. Gallinarum*. The pathogen average load was variable in adults, ranging from 3.8 to 5131.7 cells/pool. It was 35.65 in eggs, 45.5 in larvae and 1449 in protonymphs. The results proved for the first time the vertical transmission of *S. Gallinarum* by *D. gallinae*, at least from adults to protonymphs, thus highlighting how a good prophylaxis strategy for FT should never neglect the control of PRM infestations.

INTRODUZIONE

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1778), l'acaro rosso del pollame, rappresenta una notevole fonte di preoccupazione nel settore avicolo intensivo, a causa dell'impatto negativo che esercita sulla produttività e sul benessere degli animali [1]. Agli effetti diretti conseguenti alle infestazioni da *D. gallinae*, è oramai stato accertato che si aggiungono anche quelli indiretti, legati al ruolo che questo acaro può rivestire nella trasmissione di alcune malattie infettive del pollame [2]. Fra queste, una delle più rilevanti è rappresentata dalla Tifosi aviare, sostenuta da *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (S.) ser. Gallinarum. Nel corso degli anni diversi studi hanno evidenziato la relazione fra *D. gallinae* e *S. Gallinarum*, suggerendo che l'acaro possa fungere da reservoir del germe, favorendone la circolazione anche per più cicli produttivi consecutivi [3,4]. Recentemente la trasmissione di *S. Gallinarum* da parte di *D. gallinae* è stata dimostrata mediante prove in isolatori, che hanno evidenziato che gli acari, messi a contatto con animali infettati per via sperimentale, sono in grado di acquisire il patogeno ed in seguito di trasmetterlo ad animali sani [5]. Tale dimostrazione offre numerosi spunti di indagine riguardo i possibili meccanismi insiti nel ruolo vettoriale di *D. gallinae* nei confronti di *S. Gallinarum*, utili per poter comprendere al meglio la relazione fra acaro e patogeno e le possibili implicazioni in campo. Purtroppo fino ad ora non erano disponibili modelli sperimentali sufficientemente efficienti da utilizzare a supporto di questo tipo di ricerche.

Il sistema di alimentazione artificiale degli acari *in vitro* descritto recentemente da Nunn et al. (2020) [6] può risultare utile per superare queste difficoltà, consentendo la messa

a punto di protocolli standardizzati di ricerca e che garantiscono l'acquisizione di informazioni valide, in quanto riducono al minimo l'influenza di variabili incontrollate. Applicando questo metodo, è stato condotto uno studio che, tramite prove di feeding *in vitro*, ha valutato la trasmissione di *S. Gallinarum* da parte di *D. gallinae* per via verticale. In questo lavoro si riportano i primi risultati ottenuti.

MATERIALI E METODI

Prova di infezione in vitro

Per la prova di infezione *in vitro* sono stati realizzati degli appositi dispositivi secondo le indicazioni di Nunn et al. (2020) [6], costituiti da due camere separate da una membrana Baudruche (Preservation Equipment Ltd, Diss, UK). Gli acari sono stati prelevati in diversi allevamenti industriali di galline ovaiole. Una volta raccolti, sono stati sottoposti ad un periodo di *starvation* di 7 giorni a temperatura ambiente, per consentire la digestione del sangue al loro interno, ed in seguito utilizzati per le prove di feeding. Nella stessa giornata della prova è stato prelevato il sangue da galline ovaiole negative per *S. Gallinarum*, all'interno di provette addizionate con litio-eparina, per una concentrazione di 20 unità/mL di sangue, mantenendolo a +40°C fino al momento dell'utilizzo. In ciascun dispositivo sono state trasferite 50 femmine adulte mobili di *D. gallinae* ed 1 mL di sangue addizionato con 100 mL di una brodocoltura di *S. Gallinarum*, per una concentrazione finale di 10⁵ CFU/mL.

Una volta riempiti, i dispositivi sono stati tenuti a 40°C in condizioni di oscurità, per garantire agli acari di effettuare il pasto di sangue. Dopo 3 ore, gli acari ingorgati sono stati prelevati e trasferiti singolarmente nei pozzetti di una piastra per colture cellulari, sigillata da un foglio di AeraSeal (SigmaAldrich). La piastra è stata quindi incubata a 30°C per 72 e 120 ore.

Ricerca del patogeno

Considerato il ciclo biologico di *D. gallinae*, dopo 72 ore sono stati prelevati adulti, uova e larve, mentre dopo 120 ore sono state raccolte le protoninfe. In particolare, le uova sono state raccolte e processate singolarmente, previa denaturazione a 90°C per 10 minuti. Adulti, larve e protoninfe sono state raggruppate in pool da 5 esemplari per ogni stadio, estraendone il DNA mediante kit commerciali (ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, Zymo Research, California, USA), secondo le indicazioni riportate dal produttore.

Il DNA è stato quindi analizzato tramite Real Time PCR (qPCR) per la ricerca e la quantificazione di *S. Gallinarum*, come precedentemente riportato da Pugliese et al. (2018) [4]. Le prove sono state condotte in duplicato per le uova ed in quadruplo per adulti, larve e protoninfe. Le reazioni sono state condotte su piattaforma CFX Connect Real-Time PCR System (Bio-Rad Laboratories, Milano, Italia) ed i dati sono stati analizzati mediante CFX Maestro Software (Bio-Rad Laboratories).

Analisi statistica

È stata calcolata la media della carica di *S. Gallinarum* rilevata in qPCR per le diverse ripetizioni di ciascun campione. In seguito è stata calcolata la deviazione standard, facendo attenzione che questa non fosse più alta del 10%.

RISULTATI

La ricerca di *S. Gallinarum* in *D. gallinae* ha evidenziato la presenza del germe in tutti gli stadi analizzati, come riportato in tabella 1.

Tabella 1. Risultati della qPCR per la ricerca di *S. Gallinarum* nelle singole uova(**) e nei pool (*) da 5 adulti, larve e protoninfe di *D. gallinae*.

| | Adulti* | Uova** | Larve* | Protoninfe* |
|-----------------------------------|---------|--------|--------|-------------|
| Campioni testati | 4,0 | 13,0 | 8,0 | 3,0 |
| Positivi per <i>S. Gallinarum</i> | 4,0 | 1,0 | 1,0 | 2,0 |
| % | 100,0 | 7,7 | 12,5 | 66,7 |

In tabella 2 sono riepilogati i dati relativi alla quantificazione di *S. Gallinarum* nei campioni analizzati. La carica del patogeno è risultata molto variabile, in particolar modo all'interno dei pool di DNA da adulti.

Tabella 2. Carica media di *S. Gallinarum* nei diversi stadi di *D. gallinae* analizzati.

| Stadio testato | Cellule per campione |
|----------------|----------------------|
| Adulti | 5131,7 |
| Adulti | 3,8 |
| Adulti | 145,8 |
| Adulti | 4,1 |
| Uovo | 35,6 |
| Larve | 45,5 |
| Protoninfe | 1457,4 |
| Protoninfe | 1441,3 |

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio dimostrano che *D. gallinae* è in grado non solo di acquisire *S. Gallinarum* con il pasto di sangue, ma anche di trasmetterla alle generazioni successive, almeno fino allo stadio di protoninfa. Infatti, tutti i campioni di adulti e almeno un'aliquota di uova, larve e protoninfe analizzati sono risultati positivi per *S. Gallinarum* in qPCR. Tale riscontro suggerisce che *Salmonella* possa essere trasmessa per via transovarica e trans-stadiale. In ogni caso, ricerche più approfondite sono necessarie per verificare se e in che modo il germe sia in grado di colonizzare l'ovaio delle femmine adulte di *D. gallinae*.

La carica di *S. Gallinarum* nei campioni analizzati, come già osservato in ricerche precedenti [4,5], è risultata estremamente variabile, sia all'interno delle popolazioni di adulti, che fra i vari stadi intermedi. È possibile che la distribuzione di *Salmonella* negli acari adulti a seguito del pasto di sangue abbia un carattere prettamente stocastico. L'andamento crescente della carica fra i vari stadi, invece, potrebbe essere legato ad un meccanismo "a collo di bottiglia". Infatti, la quantità di *S. Gallinarum* rilevata sembra ridursi nelle uova, per aumentare leggermente nelle larve, fino a raggiungere un valore più significativo nelle protoninfe. La tendenza osservata lascia quindi supporre che possa esserci un livellamento verso il basso della carica del germe negli stadi iniziali del ciclo biologico di *Dermanyssus* (uovo e larva). Inoltre, non è escluso che *S. Gallinarum* possa moltiplicarsi all'interno degli acari, come precedentemente ipotizzato per *Salmonella* Enteritidis [7].

Da sottolineare che il sistema di feeding adottato offre il vantaggio di controllare le condizioni dell'esperienza, confinando gli acari in un ambiente separato rispetto a quello dove è presente il sangue infetto. Questo fattore consente di investigare anche sulle modalità di acquisizione del patogeno da parte di *D. gallinae*. È stato ipotizzato, infatti, che l'acaro possa infettarsi tramite il pasto di sangue oppure a seguito di una contaminazione superficiale [7]. Sebbene quest'ultima ipotesi non sia comunque da escludere, è opportuno evidenziare che il metodo utilizzato consente di selezionare come unica fonte di contaminazione il pasto di sangue.

Il ruolo vettoriale di *D. gallinae* nei confronti di *S. Gallinarum* è ormai accertato [5], così come la sua capacità di favorire la persistenza del germe in allevamento [4]. Pertanto, se analizzata nell'ottica del contesto avicolo, la trasmissione verticale di *S. Gallinarum* da parte di *D. gallinae* rappresenta un punto critico aggiuntivo, poiché potrebbe ulteriormente favorire la persistenza o, addirittura, contribuire ad aumentare la carica del germe all'interno della popolazione di acari.

CONCLUSIONI

Alla luce dei risultati ottenuti, nonostante essi siano ancora preliminari e necessitino di ulteriori approfondimenti, è possibile affermare che *D. gallinae* è in grado di trasmettere per via verticale *S. Gallinarum*. Tale riscontro conferma l'importanza del controllo delle infestazioni da *D. gallinae* tra le misure da adottare per giungere all'eradicazione della Tifosi aviaria negli allevamenti avicoli intensivi.

BIBLIOGRAFIA

1. Sigognault Flochlay A, Thomas E and Sparagano O. (2017). Poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) infestation: a broad impact parasitological disease that still remains a significant challenge for the egg-laying industry in Europe. *Parasites & Vectors*, 10, 357.
2. George RD, Finn RD, Graham KM, Mul MF, Maurer V, Valiente Moro C and Sparagano OAE. (2015). Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? *Parasites & Vectors*, 8, 178.
3. Zeman P, Štika V, Skalka B, Bártík M, Dusbábek F and Lávičková M. (1982). Potential role of *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 in the circulation of the agent of pullorosis-typhus in hens. *Folia parasitologica (Praha)*, 29, 371-374.
4. Pugliese N, Circella E, Marino M, De Virgilio C, Cocciolo G, Lozito P, Cafiero MA and Camarda A. (2018). Circulation dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar Gallinarum in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*. *Medical and Veterinary Entomology*, 33, 162-170.
5. Cocciolo G, Circella E, Pugliese N, Lupini C, Mescolini G, Catelli E, Borchert-Stuhlträger M, Zoller H, Thomas E and A Camarda. (2020). Evidence of vector borne transmission of *Salmonella enterica enterica* serovar Gallinarum and fowl typhoid disease mediated by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778). *Parasites & Vectors*, 13, 513.
6. Nunn F, Baganz J, Bartley K, Hall S, Burgess S and Nisbet A. (2020). An improved method for in vitro feeding of adult female *Dermanyssus gallinae* (poultry red mite) using Baudruche membrane (goldbeater's skin). *Parasites & Vectors*, 13, 585.
7. Valiente Moro C, Chauve C and Zenner L. (2007). Experimental infection of *Salmonella* Enteritidis by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Veterinary Parasitology*, 146, 329-336.