

VARIAZIONE NEL TEMPO DELLA SENSIBILITÀ DI *DERMANYSSUS GALLINAE* NEI CONFRONTI DI MOLECOLE ACARICIDE UTILIZZATE IN CAMPO

Caroli A.¹, Circella E.¹, Di Paola G.¹, Cafiero M.A.², Giangaspero A.³, Pugliese N.¹, Legretto M.¹, Camarda A.¹

¹ *Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"*

² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia*

³ *Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università degli Studi di Foggia.*

Summary

Time-variation of susceptibility of *Dermanyssus gallinae* against acaricides employed in field.

Dermanyssus gallinae infestation is a major threat for industrial poultry farms. The mite is worldwide diffused, and its prevalence is very high: it is reported that more than 80% of poultry farms are infested in some European Countries. The infestation leads to detriment of animal welfare and economic losses, as it negatively affects the egg and meat production. It may also contribute to the diffusion of infectious diseases as it has been widely recognized as a vector of a number of pathogens. Remarkably, *D. gallinae* could be also considered an occupational hazard, as it may infest the poultry farm workers.

Currently, the control of *D. gallinae* infestation is performed by using specific drugs such as carbamates, organophosphates, pyrethroids or amidines (amitraz), but most of them can not be used in presence of live animals. Furthermore, in field and *in vitro* reports have been assessing the increase in acaricide resistances. In the light of these premises, we evaluated the susceptibility of field populations of *D. gallinae* against three acaricide drugs, namely phoxim (an organophosphate), Amitraz and l-Cyhalothrin (a pyrethroid). A total of 68 mite populations were collected from Italian industrial poultry farms for a four-year period (2008-2012), and their susceptibility to the selected drugs have been tested at field-use concentration (1X) and at lower (1/2X and 1/4X) and higher (2X and 4X) concentrations. The data showed that l-Cyhalothrin exhibits a lower efficacy if compared with the other two drugs. By comparing the effectiveness of the drugs by years, we found that resistance to Amitraz is constantly increasing since 2008 to 2012, while effectiveness of Phoxim has been decreasing since 2009 to 2010, while it has been increasing for the last two years. The mite resistance to l-Cyhalothrin has been decreasing since 2009 to 2011, but in 2012 its efficacy has significantly collapsed. Such trends remained the same independently by the concentrations. Interestingly, higher concentrations did not provide a significant increase of drug efficacy.

On aggregate, our data show an increment in mite resistances against the most used acaricides, even if the trends are different for each drug. To avoid a further decrease in drug effectiveness, it should be advisable a turn over of drugs usually employed

against *D. gallinae* in field. The use of drugs at different concentration than those recommended by manufacturers. Finally, the understanding of the genetic bases of the acaricide resistance may greatly help to struggle the insurgence and diffusion of resistant *D. gallinae* strains.

INTRODUZIONE

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1978) (Mesostigmata: Dermanyssidae) rappresenta uno dei problemi parassitologici più rilevanti ma anche più sottovalutati che l'avicoltura moderna si trova ad affrontare. Questo acaro, infesta prevalentemente il pollo ed il tacchino, ma è segnalato anche in numerose specie di uccelli selvatici e d'affezione. È diffuso sia negli allevamenti avicoli a terra sia in quelli in batteria, prediligendo particolarmente le galline ovaiole e i riproduttori (Chauve, 1998). La sua importanza è evidente se si esaminano le statistiche sulla prevalenza negli allevamenti di vari paesi Europei ed extraeuropei: le prevalenze di *D. gallinae*, infatti, in numerosi paesi, possono raggiungere valori dell'80-90% (Sparagano *et al.*, 2009), con punte del 100% in alcune aree della Polonia (Cencek, 2003).

D. gallinae è un parassita ematofago obbligato, non permanente in quanto rimane sull'ospite solo il tempo necessario ad effettuare il pasto di sangue (Baker, 1999). Il livello di infestazione sull'animale può essere molto elevato (si stimano popolazioni di acari anche fino a 30.000 per soggetto), e si traduce frequentemente in sintomi clinici e cali della produzione che difficilmente l'allevatore attribuisce all'azione del parassita (Nordenfors *et al.*, 2000).

Questa parassitosi è da considerare senz'altro una patologia professionale; gli acari, infatti, frequentemente infestano gli operatori addetti alla cura degli animali, che riportano rush cutaneo, prurito e dermatite (Cafiero *et al.*, 2011).

D. gallinae è stato anche riconosciuto quale potenziale vettore di vari agenti patogeni (ad es. *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enteritidis*, *Chlamidia psittaci*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*) per l'uomo o per gli animali (Chirico *et al.*, 2003; Valiente Moro *et al.*, 2009; Circella *et al.*, 2011; Camarda *et al.*, 2012). Questa abilità renderebbe possibile la diffusione e la persistenza di patologie all'interno degli allevamenti anche dopo periodi di vuoto sanitario (Camarda *et al.*, 2012).

Per il controllo delle infestazioni da *D. gallinae* sono impiegate numerose molecole: carbammati, organofosforici, piretrine e piretroidi, amidine (amitraz) (Chauve, 1998). Alcune di queste, in particolare Amitraz, Piretrine e Piretroidi sono comunemente e dichiaratamente impiegate negli allevamenti avicoli italiani (Cafiero *et al.*, 2010). Un fattore limitante all'uso degli acaricidi negli allevamenti consiste nel loro divieto di utilizzazione in presenza di animali. Da pochi anni, è stata introdotta sul mercato una molecola appartenente alla classe degli organofosforici (phoxim) (ByeMite, Bayer®) caratterizzata da un periodo di sospensione di sole 12 ore e pertanto impiegabile anche in capannoni in cui siano accasati animali.

La riduzione dell'efficacia degli acaricidi segnalata in campo dagli operatori del settore, ma anche da recenti risultanze sperimentali (Marangi *et al.*, 2009) ha ispirato il presente lavoro in cui tre diverse molecole acaricide, appartenenti alle classi più frequentemente impiegate negli allevamenti, sono state testate *in vitro* su popolazioni di *D. gallinae* provenienti da aziende avicole distribuite sul territorio italiano. La ricerca, condotta in un arco di tempo di circa 5 anni, ha inteso valutare l'evoluzione della sensibilità manifestata dalle popolazioni di acari nel tempo.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra Ottobre 2008 e Luglio 2012 sono state testate popolazioni di *Dermanyssus gallinae* raccolte da un totale di 68 diversi allevamenti (2008 n.3; 2009 n.14; 2010 n.24; 2011n.14; 2012 n.13) avicoli intensivi di cui 62 di galline ovaiole e 6 di riproduttori pesanti provenienti da 8 regioni italiane (Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Abruzzo, Puglia, Basilicata, Sicilia) selezionate tra quelle a maggiore vocazione avicola. Da ciascun allevamento sono stati raccolti un minimo di 3000 acari, presenti in prossimità delle mangiatoie e dei nastri trasportatori, in tutti gli stadi del ciclo biologico. Il campione di acari, in condizioni di refrigerazione, è giunto in laboratorio entro le 24 ore dalla raccolta. All'arrivo, gli esemplari di *D. gallinae* sono stati tenuti a digiuno per 5 giorni al buio e a temperatura ambiente. Gli acaricidi sono stati testati *in vitro* alle concentrazioni consigliate dal produttore per l'uso in campo. Per il Phoxim e l'Amitraz tale concentrazione è 0,2% mentre per la λ -Cyalothrina è 0,05%. Per ogni sostanza, oltre alla concentrazione di campo, classificata come 1X, sono state testate sperimentalmente altre quattro concentrazioni, rispettivamente 2 e 4 volte superiori (2X, 4X) e 2 e 4 volte inferiori ($\frac{1}{2}$ X, $\frac{1}{4}$ X) alla dose di campo.

Il test è stato allestito secondo la metodica descritta da Thind e Muggleton già applicata in un precedente lavoro (Marangi et al., 2009). Le soluzioni degli acaricidi sono state preparate al momento dell'uso. In breve, tra due supporti in plexiglass forati al centro sono state poste carte da filtro del tipo Whatman n.1. Ciascuna carta da filtro è stata impregnata con 0,2 ml di farmaco; successivamente 20 acari a tutti gli stadi di sviluppo, raccolti *random* da ciascun campione, sono stati posizionati nella depressione centrale creata su ciascuna carta da filtro, quindi, coperti con un altro foglio circolare di carta da filtro e chiusi con delle graffette a formare delle camerette. Ciascuna cameretta è stata incubata per 24 ore a 20°C e 60% di umidità. Per ogni diluizione sono state eseguite tre ripetizioni e previsto il rispettivo gruppo controllo, costituito ciascuno da 20 acari posti su carta da filtro impregnata da un egual volume di acqua distillata. Dopo 24 ore tutte le camerette sono state aperte e sono stati contati gli acari morti e gli acari vivi.

Dalle tre ripetizioni è stato calcolato il valor medio del numero di acari trattati vivi, che, riportato nella formula seguente, ha consentito il calcolo della percentuale di efficacia:

$$\% \text{ di efficacia} = \frac{\text{n}^\circ \text{ di acari di controllo vivi} - \text{n}^\circ \text{ acari trattati vivi}}{\text{n}^\circ \text{ di acari di controllo vivi}} \times 100.$$

L'interpretazione dei risultati è stata condotta attraverso statistiche descrittive in particolare valor medi, varianze e frequenze.

In riferimento alla variazione della sensibilità nel tempo, si è scelto di escludere il 2008 dalla valutazione dei risultati a causa dello scarso numero di allevamenti testati nell'anno.

RISULTATI

Considerando i 68 campioni nel loro complesso, prescindendo dall'anno di prelievo, è stata calcolata l'efficacia media e la varianza per ogni farmaco alla concentrazione di campo, rappresentate dagli istogrammi e dalle curve riportati nelle figure fig. 1a, 1b, 1c. Confrontando le tre curve così costruite, con media e varianza pari alla media

e alla varianza per ogni farmaco, è stato possibile evidenziare graficamente le differenze dei valori di efficacia dei tre farmaci (fig. 1d).

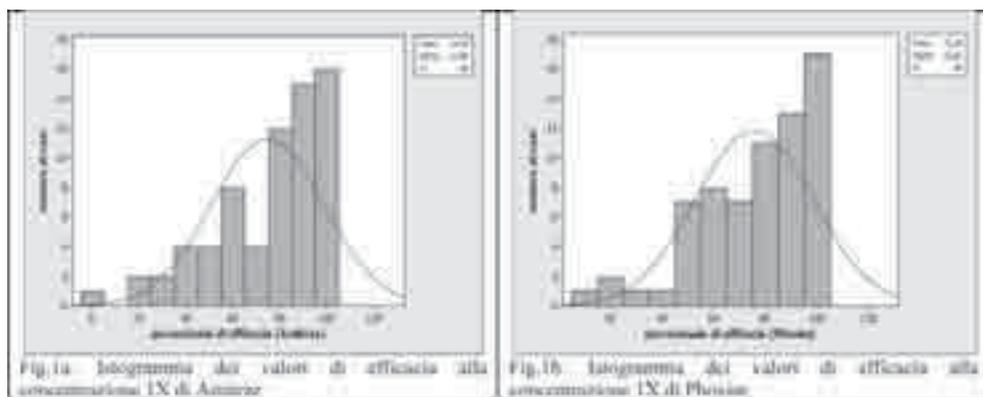


Fig.1a. Istogramma dei valori di efficacia alla concentrazione 1X di Amitraz

Fig.1b. Istogramma dei valori di efficacia alla concentrazione 1X di Phoxim

Nel complesso le curve di Phoxim e Amitraz sono risultate tra loro analoghe (valor medio di efficacia pari a 75.6% e 74.6% e Deviazione standard pari a 22.8 e 23.9); viceversa si nota un netto scostamento della λ -Cyalothrina (Fig. 1) che in generale appare meno efficace.

Confrontando i valori medi di efficacia alla concentrazione di campo, divisi per anno, si nota un differente comportamento di Amitraz e Phoxim (Fig. 2). Infatti, l'efficacia media di Amitraz, tende a diminuire significativamente dal 2009 (85,95%) al 2012 (48.85%), mentre quella di Phoxim diminuisce inizialmente tra il 2009 (81,43%) e il 2010 (68.6%) ma aumenta tra il 2011 (72.1%) e il 2012 (81.0%).

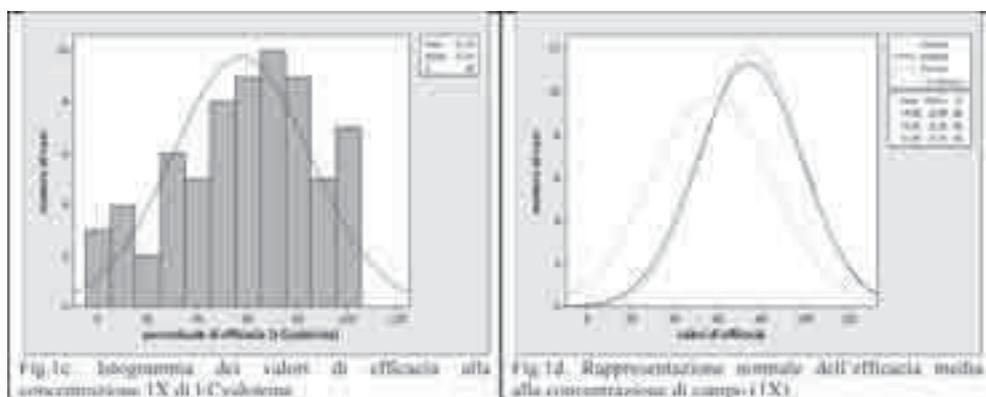


Fig.1c. Istogramma dei valori di efficacia alla concentrazione 1X di λ -Cyalotrina

Fig.1d. Rappresentazione normale dell'efficacia media alla concentrazione di campo (1X).

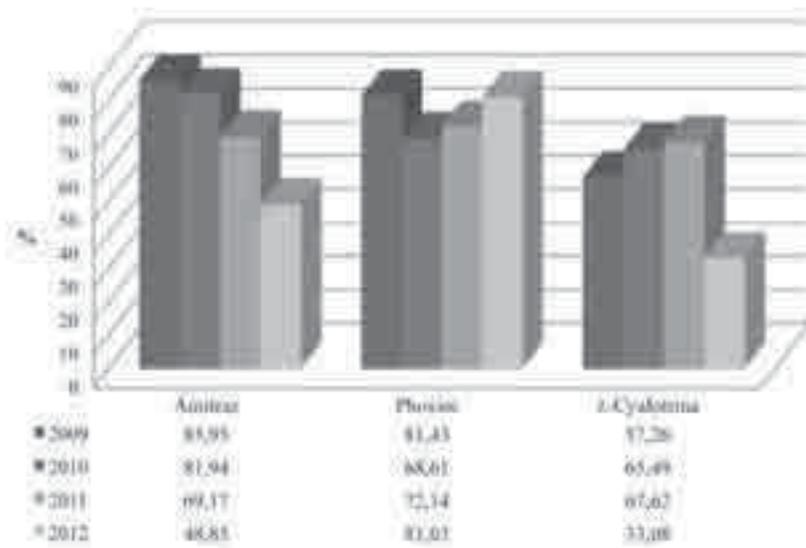


Fig. 2: Efficacia media alla concentrazione 1X per anno.

Analizzando il comportamento della singola molecola nel tempo alle diverse concentrazioni testate *in vitro*, si osservano alcune differenze. Per l'Amitraz è evidente una perdita di efficacia sia negli anni, sia al diminuire della concentrazione (Fig. 3). Per il Phoxim la tendenza è meno apprezzabile. Si osservano, infatti, soltanto variazioni dipendenti dalla concentrazione. In generale a tutte le concentrazioni eccetto la 1/4x, si osserva una diminuzione di efficacia fino all'anno 2010 e una ripresa negli anni 2011 e 2012 (Fig. 4)

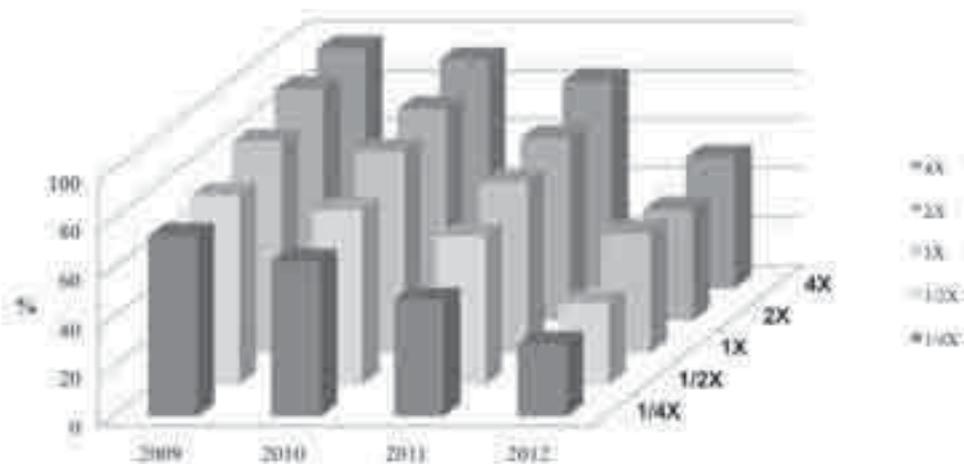


Fig.3: Efficacia media dell' Amitraz alle concentrazioni 2X, 4X, 1/2X, 1/4X, dal 2009 al 2012.

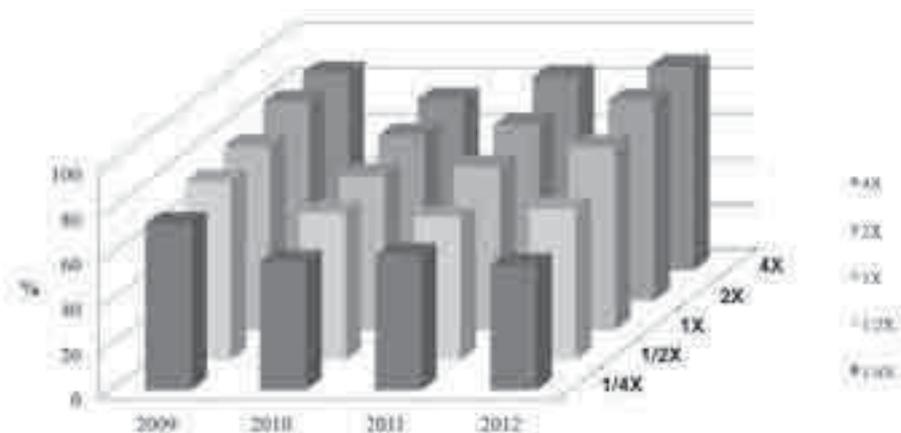


Fig.4: Efficacia media del Phoxim alle concentrazioni 2X, 4X, $\frac{1}{2}$ X, $\frac{1}{4}$ X, dal 2009 al 2012.

La λ -Cyalothrina ha un andamento diverso rispetto ai due acaricidi precedentemente analizzati; infatti, presenta una tendenza all'aumento di efficacia nella prima fase (dal 2009 al 2010), seguita da un decadimento nella seconda fase (dal 2011 al 2012) (Fig.5).

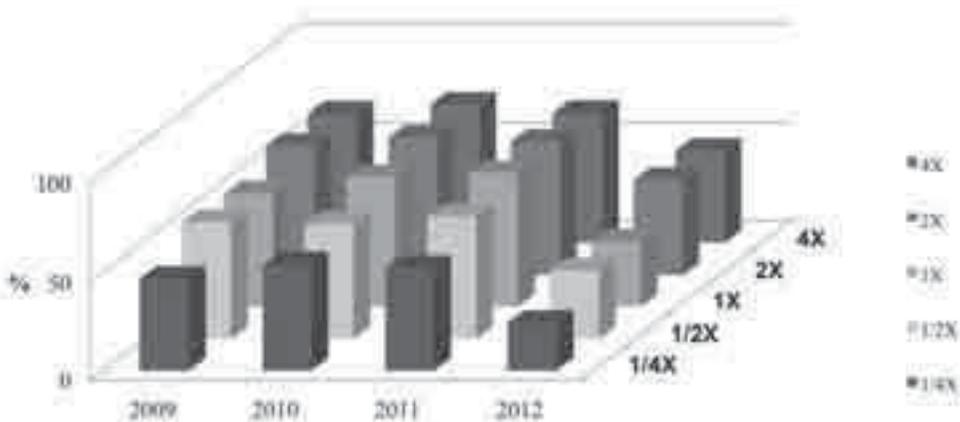


Fig.5: Efficacia media della λ -Cyalothrina alle concentrazioni 2X, 4X, $\frac{1}{2}$ X, $\frac{1}{4}$ X, dal 2009 al 2012.

Nella Fig. 6 è rappresentato lo scostamento nel tempo del livello medio di efficacia rispetto ad un anno di riferimento. Per una maggiore omogeneità della dimensione del campione nel tempo l'anno di riferimento è il 2009. L'analisi è ristretta alla comparazione tra la concentrazione di campo (1X) e quella 2 volte maggiore (2X). Per quanto concerne l'Amitraz si evidenzia nel tempo un peggioramento del livello medio di efficacia che è maggiore per la concentrazione 2X. Al contrario, per il Phoxim si nota nel tempo un contenimento della diminuzione di efficacia. La riduzione

è stata maggiore nei primi anni di osservazione. Nel complesso il comportamento delle due concentrazioni è quasi sovrapponibile.

Per la λ -Cyalothrina in una prima fase si assiste ad un incremento medio dell'efficacia, che è maggiore per la concentrazione 1X, mentre nell'ultima fase si osserva una riduzione del livello medio di efficacia, maggiormente contenuto per la 2X.

È stata, infine, considerata l'attività delle tre molecole, alle diverse concentrazioni, considerando la variabilità dell'efficacia nel campione. A tal fine sono stati costruiti degli istogrammi rappresentando le frequenze dei valori di efficacia nelle classi dell'istogramma (denominate classi di efficacia) (Fig.7). Le distribuzioni per il Phoxim e l'Amitraz evidenziano una maggior frequenza di valori di efficacia nell'intervallo compreso tra il 50% e il 100%. In particolare, alla dose di campo i valori di efficacia media si attestano maggiormente tra il 75% e il 100%. Per la λ -Cyalothrina la distribuzione è più uniforme, ed interessa con maggior frequenza rispetto alle altre molecole, le classi di efficacia comprese tra il 25%-50% e 51-75%.

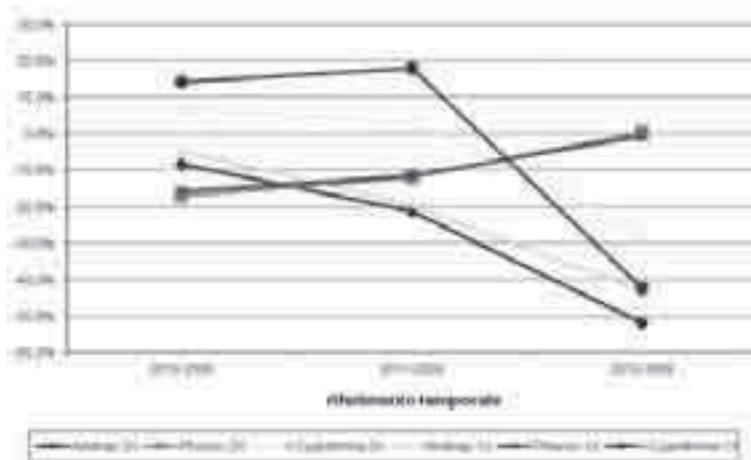


Fig.6: Scostamento percentuale del livello medio di efficacia.

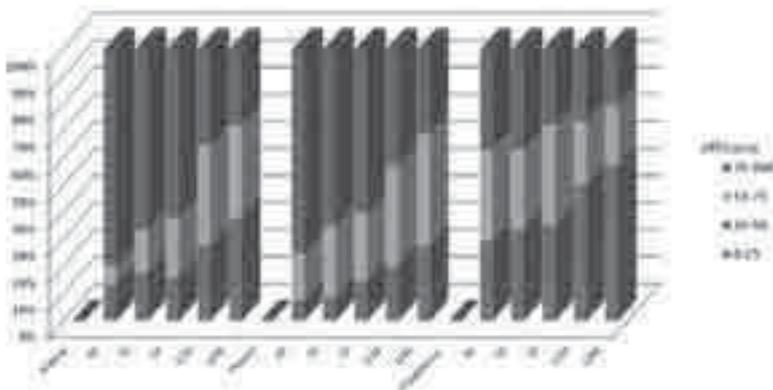


Fig. 7: Rappresentazione delle frequenze dei valori medi per classi di efficacia.

DISCUSSIONE

La resistenza degli acari ai farmaci antiparassitari è un serio problema per il controllo delle infestazioni negli allevamenti avicoli intensivi (Marangi et al., 2009). Nel presente studio, è stato valutato l'andamento dell'efficacia di tre sostanze tra le più usate come acaricidi.

Nel complesso, Amitraz e Phoxim hanno manifestato livelli di efficacia mediamente elevati. Tuttavia, le popolazioni di *D. gallinae* testate nel 2012 hanno manifestato alla concentrazione di campo un aumento della percentuale di resistenza nei confronti dell'Amitraz superiore al 50%. Al contrario, le percentuali di resistenza verso Phoxim sono più basse, attestandosi nel 2012 al 19,97%. Il calo di attività di Amitraz nei confronti dell'acaro rosso può essere giustificato da un uso ampio e frequente del prodotto, probabilmente al di fuori di razionali programmi di profilassi. Questo potrebbe aver accentuato la selezione di popolazioni resistenti e reso, nel volgere di pochi anni, il principio attivo molto meno efficace.

L'aumento della dose risolve parzialmente il problema della resistenza. Infatti, ad un aumento della concentrazione non sempre corrisponde un incremento significativo dell'efficacia, come osservato per il Phoxim. Inoltre, l'insorgenza di fenomeni di resistenza può essere maggiore per le concentrazioni più alte, come evidenziato per Amitraz.

Nel complesso la λ -Cyalothrina ha mostrato performances significativamente inferiori rispetto agli altri due acaricidi. È possibile che la causa di questo fenomeno sia ascrivibile oltre che alla resistenza specifica nei suoi confronti da parte del *D. gallinae*, anche dalla rapida degradazione del prodotto che, se da un lato garantisce una scarsa tossicità della molecola, dall'altro mal si adatta con le caratteristiche biologiche dell'acaro, il quale è generalmente ben nascosto dalle attrezzature e dalle strutture d'allevamento (ad esempio gabbie, nastri trasportatori, tubi di aereazione e di soffiaggio) e potrebbe venire in contatto con il prodotto solo dopo che questo ha perso la sua efficacia.

I dati che scaturiscono da questa esperienza mostrano che nel periodo considerato le popolazioni di *D. gallinae* che colonizzano gli allevamenti avicoli intensivi italiani sono meno suscettibili ai farmaci utilizzati per il loro controllo. È quindi auspicabile un uso accorto di queste sostanze in campo, così da non favorire la selezione di popolazioni resistenti.

L'applicazione di programmi di rotazione degli acaricidi e l'impiego di molecole preventivamente testate in laboratorio sulla popolazione di acari da trattare dovrebbero essere il principio guida nell'approccio al controllo delle infestazioni da *Dermanysus* negli allevamenti.

Non va, inoltre, sottovalutata l'importanza sia dell'impiego di soli prodotti il cui uso sia autorizzato in presenza di animali, al fine di evitare il rischio della persistenza di residui nelle carni e nelle uova, sia di molecole per le quali non sia proibita da tempo la commercializzazione.

A questo proposito, un recente studio ha dimostrato la presenza di residui di Permetrina e soprattutto di Carbaryl (molecola il cui impiego è vietato in UE dal 2007) su campioni di pelle e grasso di ovaiole a fine carriera (Marangi et al., 2012). È evidente che la diffusione e la manipolazione di dati di questo tipo potrebbero avere ripercussioni negative sull'intero comparto avicolo.

Un'ultima considerazione deve necessariamente riguardare la modalità e la frequen-

za di somministrazione dei prodotti acaricidi che spesso inficia l'efficacia stessa del trattamento anche quando sono utilizzate molecole attive nei confronti degli acari.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dimostrano che, a causa di un impiego non corretto o un abuso di trattamenti acaricidi, l'efficacia degli acaricidi può variare nel tempo e, una riduzione di efficacia può essere dovuta alla selezione di popolazioni di *Dermanyssus* resistenti che risultano sempre più difficili da controllare.

Il ricorso a programmi di profilassi che non si limitino al solo uso di molecole anti-parassitarie è pertanto fondamentale per ottenere risultati positivi nella lotta contro *Dermanyssus gallinae*.

In particolare, si dovrebbe evitare l'uso di concentrazioni diverse da quelle ottimali. Infatti, concentrazioni più basse potrebbero favorire la selezione e quindi la comparsa di ceppi resistenti, mentre l'impiego di molecole a concentrazioni più elevate, oltre a non escludere la possibilità di selezione di ceppi resistenti, determinerebbe danni (ambientali economici, sanitari) che non giustificerebbero affatto il pur immediato beneficio.

BIBLIOGRAFIA

Baker A.S. (1999). Mites and ticks of domestic animals. An identification guide and information source. The Stationery Office, The Natural and History Museum, London 240 pp.

Cafiero M. A., Galante D., Camarda A., Giangaspero A., Sparagano O. (2011). Why dermanyssosis should be listed as an occupational hazard. *Occupational and Environmental Medicine*, 68(8): 628.

Cafiero M.A., Camarda A., Giangaspero A., Circella E., Sparagano O.A.E. (2010). Epidemiology and health risks related to *Dermanyssus gallinae* infestation. *Parasitologia*, 52: 53-56.

Camarda A., Pugliese N., Legretto M., Cafiero M. A., Stonfer M., Circella E. (2012). Survey on the presence of *Salmonella gallinarum* in *Dermanyssus gallinae* in intensive Poultry farms. WPC2012 Salvador - Bahia - Brazil, 5 - 9 August - 2012 World's Poultry Science Journal, Supplement 1, 335-337

Cencek T. (2003). Prevalence of *Dermanyssus gallinae* in poultry farms in Silesia Region in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 47:465-469.

Chauve C. (1998). The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer 1778): current situation and future prospects for control. *Veterinary Parasitology* 79(3): 239-245.

Chirico J., Eriksson H., Fossum O., Jansson D. (2003). The poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, a potential vector of *Erysipelothrix rhusiopathiae* causing erysipelas in hens. *Medical and Veterinary Entomology*, 17: 232-234.

Circella E., Pugliese N., Todisco G., Cafiero M. A., Sparagano O. A., Camarda A. (2011). *Chlamydia psittaci* infection in canaries infested by *Dermanyssus gallinae*. *Experimental & Applied Acarology*, 55(4): 329-338.

Marangi M., Cafiero M. A., Capelli G., Camarda A., Sparagano O. A.E., Giangaspero A. (2009). Evaluation of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae) susceptibility to some acaricides in field populations from Italy. *Experimental & Applied Acarology*, 48(1-2): 11-8.

- Marangi M., Morelli V., Pati S., Camarda A., Cafiero M. A., Giangaspero A. (2012). Acaricide residue in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. PloS one, 7(2): e31795.
- Nordenfors H., Hoglund J. (2000). Long term dynamics of *Dermanyssus gallinae* in relation to mite control measures in aviary systems for layers. British Poultry Science, 41:533-540.
- Sparagano O., Pavlicevic A., Murano T., Camarda A., Sahibi H., Kilpinen O., Mul M., Van Emous E., Le Bouquin S., Hoele S., Cafiero M.A. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infection in poultry farm system. Experimental & Applied Acarology, 48: 3-10.
- Thind B. B., Muggleton J. (1998). A new bioassay method for the detection of resistance to pesticides in the stored product mite *Acarus siro* (Acari: Acaridae). Experimental & Applied Acarology, 22: 534-552.
- Valiente Moro C., De Luna C. J., Tod A., Guy J. H., Sparagano O. A. E., Zenner L. (2009). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. Experimental & Applied Acarology, 48: 93-104.