

CONFERMA SPERIMENTALE DELLA TRASMISSIONE VETTORIALE DELLA TIFOSI AVIARE MEDIATA DA *DERMANYSSUS GALLINAE*

Cocciolo G.¹, Circella E.¹, Pugliese N.¹, Lupini C.², Mescolini G.², Zoller H.³, Borchert-Stuhlträger M.³, Thomas E.³, Catelli E.², Camarda A.¹

¹ *Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Italy*

² *Department of Veterinary Medical Science, University of Bologna, Italy*

³ *MSD Animal Health Innovation GmbH, Germany*

Summary

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1778) is a major ectoparasite of poultry, widely diffused all over the world. Beside this direct effect on the animal welfare, it is well known for being associated with many pathogens, including *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum, the aetiological agent of the fowl typhoid. The association between *D. gallinae* and *Salmonella* Gallinarum has been already demonstrated under laboratory condition (Zeman et al., 1982) and in field (Pugliese et al., 2018), but the current data are not enough to demonstrate the role of the mite as a vector of fowl typhoid. Therefore, the aim of this study was the assessment of the vectorial role of *D. gallinae* in controlled condition of infection and infestation.

Specifically, four groups of laying hens, each consisting of eight individuals, were located in as many isolators. Two groups were artificially infected by gavage with *S. Gallinarum* (6x10¹⁰ CFU/ml) and, seven days after, they were infested with about 25,000 mites. Mites were collected 72 hours after infestation, starved and then used to infest hens of the other two groups.

The clinical signs, the mite contamination, the *S. Gallinarum* colonization of in hens' organs were evaluated and recorded during the entire investigation. The gathered data were used to calculate the infection rate and the vectorial capacity of *D. gallinae* to transmit *S. Gallinarum*.

Results showed that the mites became infected 24 hours after the infection of the hens and that, following infestation, the healthy chickens were affected by fowl typhoid. *S. Gallinarum* was detected in the organs of animals from the infested groups to confirm the origin of the disease.

On aggregate, all data proved that *D. gallinae* act as a vector of fowl typhoid as it transmits *S. Gallinarum* from infected to healthy laying hens, in a very effective way.

INTRODUZIONE

L'acaro rosso del pollame *Dermanyssus (D.) gallinae* è un ectoparassita molto diffuso negli allevamenti avicoli a vita produttiva lunga [1]. Oltre ai ben documentati effetti negativi sugli animali allevati [2], si suppone che *D. gallinae* possa giocare un ruolo nella trasmissione di numerosi agenti patogeni [3]. Tra questi, uno dei più pericolosi per l'allevamento avicolo è *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (S.) ser. Gallinarum, microrganismo responsabile della tifosi aviare [3]. L'associazione tra *D. gallinae* e *S. Gallinarum* è stata verificata già negli anni '80 [4]; più recentemente, è stato osservato che in campo esiste

una stretta relazione tra circolazione del patogeno nell'allevamento, severità dell'infestazione e carica patogena nell'acaro [5]. Tuttavia, nonostante i numerosi indizi, non è ancora stata prodotta la prova definitiva della trasmissione del patogeno e/o della malattia mediata da *D. gallinae*.

Pertanto, il presente studio è stato mirato ad ottenere tale prova ricostruendo in idonei isolatori i passaggi di infezione, infestazione e trasmissione necessari per stabilire il ruolo vettoriale dell'acaro nei confronti di *S. Gallinarum*.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Trentadue galline ovaiole SPF Hy-Lyne® Brown di 10 mesi di età sono state divise in quattro gruppi e collocate in altrettanti isolatori. Ogni animale era riconoscibile da un codice univoco stampigliato su un anello apposto alla zampa sinistra. Le galline negli isolatori A e B sono state infettate (D1) mediante somministrazione orale di 6×10^7 CFU di un ceppo patogeno di *S. Gallinarum*.

Dopo 7 giorni (D8), sono stati introdotti circa 25.000 acari rossi del pollame in ognuno dei due isolatori A e B. Dopo due giorni gli acari sono stati rimossi mediante delle trappole in legno, tenuti in starvation per 24 h e reintrodotti negli isolatori C e D (D11). Le galline sopravvissute dei gruppi A e B sono state sottoposte a eutanasia contestualmente alla rimozione degli acari, mentre le altre sono state tenute in osservazione per altri 24 giorni dopo l'infestazione.

Lo stato di salute di tutte le galline è stato monitorato due volte al giorno e classificato secondo uno *score* clinico (*clinical score*) allestito sulla base degli indicatori elencati in Tab. 1. Ciascun soggetto è stato considerato ammalato quando il *clinical score* giornaliero era superiore a 4.

A periodi prestabiliti sono stati inoltre raccolti dei campioni di feci, da cui è stata effettuata la ricerca di *S. Gallinarum* mediante seminested PCR (snPCR) e indagine colturale [8].

Tabella 1. Criteri per l'assegnazione del punteggio clinico sulla base dello stato di salute delle galline.

Segni clinici osservati	Punteggio
Comportamento normale, assenza di segni di malattia	1
Diarrea	2
Abbattimento del sensorio	4
Abbattimento del sensorio e diarrea	5
Letargia	6
Letargia e diarrea	7
Morte	40

Campionamento e analisi degli acari

A D9 e D11 sono state raccolte aliquote da 100 acari ciascuna dagli isolatori A e B.

A D10, altre due aliquote sono state ottenute dalle trappole prelevate dagli stessi isolatori. A D36, alla fine della sperimentazione, sono stati raccolti gli acari che erano rimasti negli isolatori A e B e il maggior numero possibile di acari presenti negli isolatori C e D. In tutti i casi sono state preparate delle aliquote da 100 acari ciascuna.

Alcune delle aliquote ottenute dagli isolatori C e D a D36 sono state lavate con formalina.

Da tutte le aliquote ottenute è stato estratto il DNA mediante kit commerciali (Thermo Scientific, Milano, Italia). Questo è stato utilizzato per la ricerca e quantificazione di *S. Gallinarum* rispettivamente mediante seminested PCR (snPCR) [6] e real-time PCR (qPCR) [5].

Esame necroscopico e studio degli organi

L'esame necroscopico è stato effettuato per tutte le galline, decedute spontaneamente o sottoposte ad eutanasia. Dopo la necropsia sono stati prelevati gli organi bersaglio, nello specifico fegato, milza, ovario e ceco. A partire da 30 mg di tessuto è stata effettuata l'estrazione di DNA utilizzando kit commerciali (Thermo Scientific) per accertare l'infezione da *S. Gallinarum* mediante snPCR [6].

Analisi statistica

Preliminarmente, è stata verificata la distribuzione normale dei dati numerici ottenuti, relativamente alla carica di *S. Gallinarum* rilevata negli acari, mediante il test di Shapiro-Wilk. Rilevata la loro non normalità, sono stati adottati test non parametrici per lo studio e il confronto di tali dataset. I dati categorici (numero degli animali ammalati o deceduti, organi positivi a *S. Gallinarum*) sono stati confrontati mediante il test esatto di Fisher. Tutte le analisi statistiche sono state condotte in R v. 3.6.1.

Inoltre, è stato stimato il tasso d'infezione (IR) attraverso l'add-in di Microsoft Excel® PooledInfRate, messo a punto dal Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [7], il tasso d'infezione entomologico (EIR) che mette in relazione IR e numero di artropodi che entrano in contatto con un ospite [8], e la capacità vettoriale, che quantifica la probabilità che un artropode possa trasmettere un patogeno dopo il contatto con un ospite infetto [9, 10].

Autorizzazione

La sperimentazione è stata autorizzata dal Ministero della Salute (aut. n. 718/2017-PR del 2 ottobre 2017). Tutte le operazioni sono state condotte nel pieno rispetto della normativa europea sul benessere animale n. 2010/63/EU.

RISULTATI

Insorgenza della tifosi aviare

Quindici galline ovaiole sulle sedici appartenenti ai gruppi A e B hanno mostrato segni di tifosi aviare e 6 ne sono morte, e 13, di cui 11 sono decedute, si sono ammalate nei gruppi C e D.

La Tab.2 riepiloga incidenza e mortalità osservate.

Tabella 2. Incidenza e mortalità osservate nei gruppi sperimentali.

Gruppo	Ammalate	Decedute
A	8	1
B	7	5
A+B	15	6
C	7	7
D	6	4
C+D	13	11

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata in termini di animali ammalati ($P = 0.600$) o deceduti ($P = 0.181$).

L'esame necroscopico ha confermato il sospetto di tifosi aviare in tutti i gruppi che presentavano le tipiche lesioni, tra cui, decolorazione della cresta e dei bargigli, imbrattamento cloacale da diarrea, congestione ed ipertrofia di fegato e milza, che presentavano focolai necrotici in superficie. In alcuni casi si osservavano ovarite necrotica e congestione del rene.

A conferma della diagnosi, *S. Gallinarum* è stata identificata da almeno un organo di tutti i 32 animali inclusi nella sperimentazione.

Invece, non è stato rilevato il patogeno dai tamponi cloacali.

Relazione tra Dermanyssus gallinae e Salmonella enterica subsp. enterica ser. Gallinarum

Tutte le aliquote di acari saggiate, eccetto una, sono risultate positive per *S. Gallinarum*. Su queste è stato calcolato un IR pari a 27.93 acari infetti per mille, un EIR di 25.14 contatti infetti per mille, ed una capacità vettoriale di 467.42.

La carica media degli acari raccolti dagli isolatori A e B nei tre giorni successivi l'infestazione è stata di 16.71 cellule di *S. Gallinarum* per acaro, e di 168.69 cellule per acari nei gruppi prelevati dagli isolatori C e D al termine della sperimentazione (D36). La differenza, tuttavia, non era pienamente significativa, anche se il dato cade nel limite di significatività ($P = 0.073$).

Il patogeno è stato rilevato anche da tutte le aliquote lavate con formalina, e in questo caso la media è stata di 133.69 cellule di *S. Gallinarum* per acaro, senza differenze significative rispetto alla carica delle aliquote non lavate ($P = 0.211$).

DISCUSSIONE

Nel complesso, i dati indicano che *D. gallinae* è stato in grado di trasmettere *S. Gallinarum* dalle galline infette a quelle sane. Infatti, poiché tutti gli animali sono stati alloggiati in isolatori durante l'intero svolgimento della sperimentazione, l'unico punto di contatto tra i gruppi infetti (A e B) e i gruppi infestati (C e D) sono stati gli acari. Inoltre, considerato che la maggior parte degli animali di questi ultimi due gruppi hanno anche manifestato la malattia, è evidente che *D. gallinae* è in grado di introdurre nell'ospite sano una quantità di patogeno sufficiente a sviluppare la malattia.

I dati fanno inoltre supporre che, molto probabilmente, gli acari si sono infettati

attraverso il pasto di sangue, poiché le deiezioni delle galline ovaiole erano poco accessibili e, in ogni caso, l'eliminazione di *S. Gallinarum* era assente (o perlomeno ridotta) vista la negatività dei campioni di feci. Questo spiegherebbe anche la contaminazione interna degli acari, evidenziata dall'identificazione del patogeno anche dalle aliquote lavate con formalina.

Resta però il dubbio sull'effettiva modalità di trasmissione agli animali. Infatti, *D. gallinae* potrebbe veicolare *S. Gallinarum* mordendo l'ospite per effettuare il pasto di sangue, o venendo ingerito dalle galline che si beccano per il fastidio dell'infestazione. Per chiarire il processo di trasmissione saranno necessari studi mirati.

Nonostante questa incognita, l'acaro rosso del pollame ha tutti i requisiti per essere un importante vettore della tifoosi aviare. In particolare, è da sottolineare il notevole valore della capacità vettoriale, legato all'alto tasso di sopravvivenza di *D. gallinae* e all'elevata proporzione di acari che può attaccare un ospite. Per questo non devono trarre in inganno l'IR e l'EIR: una proporzione di circa 25 contatti infetti per mille può sembrare un valore basso ma deve essere messo in relazione con il numero di acari che ogni notte svolge il pasto di sangue su ciascun animale, stimato intorno ai 50.000 nei casi di infestazione più massiva, condizione questa che aumenta notevolmente le probabilità di trasmissione della malattia.

CONCLUSIONI

Le ricerche presentate in questo lavoro dimostrano senza ombra di dubbio che galline affette da tifoosi aviare possono infettare *D. gallinae* con *S. Gallinarum*, e che il germe può essere a sua volta trasmesso dall'acaro ad animali sensibili.

Il controllo efficace della malattia non potrà pertanto prescindere dal concomitante contenimento della popolazione infestante di acari, da realizzare attraverso una gestione integrata (Integrated Pest management, IPM) che preveda, accanto ai trattamenti con acaricidi, anche l'implementazione di buone pratiche igieniche e di biosicurezza.

BIBLIOGRAFIA

1. Sigournault-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. *Parasit. Vectors*. 10: 357.
2. Kilpinen O, Roepstorff A, Permin A, Nørgaard-Nielsen G, Lawson LG and Simonsen HB. (2005) Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behavior and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*). *Br. Poult. Sci*. 46: 26-34.
3. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OAE and Zenner L. (2009) The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp. Appl. Acarol*. 48: 93-104.
4. Shivaprasad HL and Barrow PA. (2013) Pullorum disease and fowl typhoid. In: Swine DE, (ed.), *Diseases of Poultry, thirteenth edition*. John Wiley & Sons, Ames, pp. 678-693.
5. Zeman P, Štika V, Skalka B, Bártík, 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 Parasitol. (Praha)* 29: 371-374.
6. Pugliese N, Circella E, Marino M, De Virgilio C, Cocciolo G, Lozito P, Cafiero MA and Camarda A. (2019) Circulation dynamics of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar Gallinarum in a poultry farm infested by *Dermanyssus gallinae*. *Med. Vet. Entomol.* 33: 162-170.
 7. Pugliese N, Circella E, Pazzani C, Pupillo A and Camarda A. (2011) Validation of a seminested PCR approach for rapid detection of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum. *J. Microbiol Methods* 85: 22-27.
 8. Biggerstaff BJ. (2009) PooledInfRate, version 4.0: a Microsoft® Office Excel® add-in to compute prevalence estimates from pooled samples. Centers for Disease Control and Prevention. Fort Collins, USA. <https://www.cdc.gov/westnile/resourcepages/mosqSurvSoft.html> Ultimo accesso 12 luglio 2019.
 9. Nepomichene TNJJ, Tata E and Boyer S. (2015) Malaria case in Madagascar, probable implication of a new vector, *Anopheles coustani*. *Malar. J.* 14: 475.
 10. Macdonald G. (1961) Epidemiologic models in studies of vector-borne diseases. *Public Health Rep.* 76: 753-764.