

AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI* E *DERMANYSSUS GALLINAE*. UNA RELAZIONE ANCORA DA SCOPRIRE

Schiavone A.¹, Pugliese N.¹, Circella E.¹, Sangiorgi A.², Magrini M.², Camarda A.¹

¹ Dipartimento di Medicina Veterinaria, Sezione di Patologia Aviaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

² MSD Animal Health

Summary

Colibacillosis is an infection caused by Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), associated with a wide variety of clinical forms, which has a strong impact on industrial poultry system. The pathogen is persistent in flocks, probably due to its relationship with potential vectors or reservoirs, most of them still unknown. Among those, an important role might be played by *Dermanyssus gallinae*, whose prevalence can even reach 90% of the intensive laying hen farms.

In this work, the association between *D. gallinae* and pathogenic *E. coli* serogroups O2 and O78 has been verified by analyzing mites from 18 Italian laying hen farms, some of them with ongoing colibacillosis outbreaks.

Specifically, 24 populations of *D. gallinae*, from as many flocks of laying hens, were included in the study. Furthermore, 25 mite aliquots were prepared from mites collected in a farm selected for experiencing colibacillosis. Twelve out of those 25 aliquots were washed by 4% formalin.

The detection of *E. coli* was performed by using bacteriological procedures and PCR, while qPCR was used instead of PCR for the detection and quantification of *E. coli* O2 from the 25 aliquots deriving from the colibacillosis focus.

Escherichia coli was detected in 61% of the 18 tested farms. The molecular characterization of the isolates revealed the presence of the serogroups O2 and O78 in the 16% and 5% of the monitored farms, respectively.

In the colibacillosis focus, *E. coli* O2 was detected and isolated from both dead animals and mites. Moreover, *E. coli* was retrieved from both formalin-washed and unwashed aliquots, letting suppose that the pathogen might contaminate the inner parts of mites.

The estimated values of the *E. coli* O2 load per mite and the infection rate (IR) both returned an apparently low mean value, which needs to be weighed against the infestation level inside the flock.

In conclusion, the present study allowed to establish a direct relationship between *D. gallinae* and APEC for the first time, paving the way to the hypothesis that this mite could act as an important reservoir and a potential vector for the disease.

INTRODUZIONE

Le colibacillosi hanno un notevole impatto sull'allevamento avicolo intensivo in tutto il mondo e sono responsabili di perdite economiche rilevanti in tutta la filiera avicola. Esse sono generalmente causate dai cosiddetti Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) [1]. Tra questi, i sierogruppi più frequentemente associati a malattia sono O1, O2, O8, O18, O35, O78, O109 e O115, con gli O1, O2

e O78 che rappresentano l'80% dei casi [2].

Uno degli aspetti più critici delle colibacillosi aviarie è rappresentato dall'elevata persistenza degli APEC, che possono permanere in allevamento per lunghi periodi, e riemergere anche durante cicli successivi [1]. Le ragioni di tale resistenza non sono ancora del tutto note. Se da una parte sicuramente pesano le caratteristiche intrinseche del batterio, per esempio la capacità di formare biofilm, dall'altra la dispersione orizzontale del germe all'interno del capannone può essere favorita dalla presenza di vettori passivi quali *Alphitobius diaperinus* e *Musca domestica* [3, 4, 5].

Non si può escludere però che altri fattori possono intervenire, favorendo la sopravvivenza del germe tra un ciclo e l'altro. Uno di questi potrebbe essere *Dermanyssus gallinae*. Questo acaro ematofago è diffuso in oltre il 90% degli allevamenti avicoli intensivi [6], esercita un'azione depauperante e stressante sugli animali [7], e può fungere da serbatoio e vettore di diversi patogeni del pollame [8].

Ad oggi le informazioni sulla possibile associazione tra *E. coli* e *D. gallinae* sono pressoché assenti, pertanto questo studio si propone di valutare una potenziale relazione tra essi, con particolare attenzione al rapporto che si può instaurare con i sierogruppi patogeni O2 e O78.

MATERIALI E METODI

Indagine a campione

Lo studio è stato condotto su campioni di *D. gallinae* prelevati da 24 gruppi di galline ovaiole facenti parte di 18 allevamenti in tutta Italia, raccolti fra dicembre 2018 e aprile 2019 mediante trappole AVIVET [9] ed inviati in cieco presso la Sezione di Patologia Aviare dell'Università degli Studi di Bari. Qui sono stati sottoposti ad esame batteriologico colturale ed identificazione biochimica mediante sistema MicroBact (Thermo Scientific, Milano, Italia). Gli isolati di *E. coli* sono stati successivamente tipizzati mediante PCR per definirne l'appartenenza ai sierogruppi O2 e O78 [10, 11].

Indagini in campo

Indagini più approfondite sono state effettuate a partire da un allevamento di 22.000 galline ovaiole della provincia di Lecce.

Nell'azienda erano contestualmente presenti un'infestazione da *D. gallinae* di livello IV della scala di Cox [12] ed un focolaio di colibacillosi in atto che faceva registrare una mortalità giornaliera di 4-12 soggetti, associata ad un calo della deposizione stimato del 5% e ad alterazioni qualitative delle uova.

Dieci galline spontaneamente decedute sono state prelevate dall'allevamento e sottoposte ad esame necroscopico, durante il quale sono stati prelevati fegato, milza e sangue del cuore, da cui è stata effettuata la ricerca di *E. coli* mediante la procedura colturale. Anche in questo caso il sierogruppo degli isolati è stato individuato mediante PCR [10, 11].

Gli acari raccolti dallo stesso allevamento sono stati quindi suddivisi in 25 aliquote da 50 o da 100 acari. Dodici di queste sono state sottoposte a lavaggi con formalina al 4%, al fine di valutare se *E. coli* si localizzasse solo all'esterno o anche all'interno di *D. gallinae*. Tutte le aliquote sono state analizzate mediante real-time PCR per l'identificazione e la quantificazione di *E. coli* O2 negli acari. In seguito, sono

stati calcolati la stima di massima verosimiglianza (MLE) del tasso di infezione (IR) degli acari mediante software l'add-in di Microsoft Excel® PooledInfRate [12], e la carica media di *E. coli* O2 per acaro.

RISULTATI

Monitoraggio in cieco

La ricerca di *E. coli* a partire dalle aliquote di acari raccolte dai 18 allevamenti sottoposti a monitoraggio ha evidenziato la presenza di tale specie batterica nel 61% delle aziende testate (11/18). Inoltre, i sierogruppi O2 e O78 sono stati individuati negli acari prelevati dal 22% degli allevamenti; nello specifico, 3 gruppi di acari erano positivi a O2 e 1 a O78.

Studio del caso

L'esame necroscopico eseguito sugli animali prelevati dall'allevamento oggetto di approfondimento ha evidenziato lesioni compatibili con la colibacillosi, in particolare nel quadro della polisierosite. Nello specifico, è stato osservato inspessimento del peritoneo, ovarite con presenza di follicoli ovarici nella cavità addominale, presenza di essudato fibrinoso su pericardio, capsula glissoniana e sacchi aerei. Inoltre, a causa della massiva infestazione da *D. gallinae*, era possibile osservare una grave anemia che si manifestava con decolorazione della cresta e delle mucose, accompagnata dal riscontro di numerosi acari sulle carcasse. *Escherichia coli* O2 è stato isolato dalla maggior parte degli organi prelevati.

E. coli O2 è stato identificato inoltre da 19 delle 25 aliquote di acari, precisamente da 12 su 13 non lavate, e da 7 su dodici lavate con formalina.

Alla luce di questi risultati la stima della IR è stata pari a 24,39 acari infetti su 1.000, con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 13,71 e 56,88%.

Invece, la carica di *E. coli* O2 per acaro era molto variabile. Negli acari non lavati è stata calcolata una media pari a 516,59 cellule per acaro, e a 315,00 cellule per acaro nelle aliquote lavate. Tale differenza è risultata essere non significativa ($P=0,650$).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio supportano fortemente la tesi di un'associazione fra *D. gallinae* ed *E. coli*. L'indagine condotta sulle popolazioni di acari, infatti, ha consentito di isolare il batterio in più della metà degli allevamenti testati, anche con il riscontro di sierogruppi potenzialmente patogeni quali O2 e O78.

Inoltre, l'analisi del focolaio di colibacillosi ha messo in evidenza che *D. gallinae* ospitava lo stesso sierogruppo di *E. coli* che stava causando la malattia nelle galline ovaiole. Tale associazione sembra particolarmente interessante, visto che il patogeno non è soltanto un mero contaminante superficiale dell'acaro, ma che esso è in grado di penetrare, attraverso la cuticola o direttamente attraverso il pasto di sangue, nei distretti interni dell'artropode.

Anche il tasso d'infezione è piuttosto significativo, in quanto è dello stesso ordine di grandezza di quello riscontrato per *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *Gallinarum* [14]. Nonostante esso sia apparentemente basso (circa 24 acari infetti ogni mille) si deve tener conto dei livelli di infestazione osservabili in campo. È noto, infatti, che in caso di infestazioni massive ogni notte almeno 50.000 acari possono

nutrirsi su una singola gallina [15]. Questo implica che ogni gallina potrebbe venire a contatto, ogni notte, con centinaia di acari infetti. Ovviamente, sarà necessario disegnare studi appropriati per avere il necessario riscontro della trasmissione dall'acaro all'ospite per poter definire *D. gallinae* come vettore.

CONCLUSIONI

Questo è, per quanto di nostra conoscenza, il primo lavoro che ha dimostrato l'associazione esistente fra *D. gallinae* ed *E. coli*, in particolare nei confronti dei sierogruppi patogeni O2 e O78. Si tratta di uno studio preliminare, i cui dati potrebbero però aprire all'ipotesi che *D. gallinae* possa avere un ruolo determinante nella circolazione e nella persistenza di ceppi APEC.

BIBLIOGRAFIA

1. Nolan LK, Barnes HJ, Vaillancourt J, Abdul-Aziz T and Logue CM (2013). Colibacillosis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL and Nair V (Eds.), *Diseases of Poultry 13th Edition*, John Wiley & Sons, Hoboken, US. pp. 751-805.
2. KATHAYAT D, HELMY YA, DEBLAIS L, RAJASHEKARA G. (2018) NOVEL SMALL MOLECULES AFFECTING CELL MEMBRANE AS POTENTIAL THERAPEUTICS FOR AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*. *SCI. REP.* 8: 15329.
3. Goodwin MA and Waltman WD (1996). Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. *J. Appl. Poult. Res.* 5: 51-55.
4. McAllister JC, Steelman CD, Skeeles JK, Newberry LA and Gbur EE (1996). Reservoir competence of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera:Tenebrionidae) for *Escherichia coli* (Eubacteriales:Enterobacteriaceae). *J. Med. Entomol.* 33: 983-987.
5. Rochon K, Lysyk TJ and Selinger LB. (2005). Retention of *Escherichia coli* by house fly and stable fly (Diptera:Muscidae) during pupal metamorphosis and eclosion. *J. Med. Entomol.* 42: 397-403.
6. Sparagano OAE, Pavličević A, Murano T, Camarda A, Sahibi H, Kilpinen O, Mul-M, van Emous R, le Bouquin S, Hoel K and Cafiero MA. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Exp. Appl. Acarol.* 48: 3-10.
7. 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. *Parasit. Vectors* 10: 357.
8. 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.
9. Lammers GA, Bronneberg RGG, Vernooij JCM and Stegeman JA. (2017). Experimental validation of the AVIVET trap, a tool to quantitatively monitoring the dynamics of *Dermanyssus gallinae* population in laying hens. *Poult. Sci.* 96: 1563-1572.
10. Liu B, Wu F, Li D, Beutin L, Chen M, Cao B and Wang L. (2009). Development of a serogroup-specific DNA microarray for identification of *Escherichia*

- coli* strains associated with bovine septicemia and diarrhea. *Vet. Microbiol.* 142: 373-378.
11. Fratamico PM, Yan X, Liu Y, DebRoy C, Byrne B, Monaghan A, Fanning S and Bolton D. (2010). *Escherichia coli* serogroup O2 and O28ac O-antigen gene cluster sequences and detection of pathogenic *E. coli* O2 and O28ac by PCR. *Can. J. Microbiol.* 56: 308-316.
 12. Mul MF, van Riel JW, Meerburg BG, Dicke M, George DR and Groot Koerkamp PWG. (2015). Validation of an automated mite counter for *Dermanyssus gallinae* in experimental laying hen cages. *Exp. Appl. Acarol.* 66: 589-603.
 13. Biggerstaff BJ. (2009). *PooledInfRate, Version 4.0: a Microsoft Office Excel add-in to compute prevalence estimates from pooled samples*. Center for Disease Control and Prevention, Fort Collins, CO, U.S.A.
 14. 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.
 15. Sparagano OAE, George DR, Harrington DWJ and Giangaspero A. (2014) Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annu. Rev. Entomol.* 59: 447-466.