

RUOLO DI *DERMANYSSUS GALLINAE* NELLA PERSISTENZA DI *SALMONELLA GALLINARUM* IN ALLEVAMENTO

Marino M.¹, Pugliese N.¹, Circella E.¹, Cocciolo G.¹, De Virgilio C.², Romito D.¹, D'Onghia F.¹, Camarda A.¹

¹*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", S.p. per Casamassima km 3, 70010, Valenzano (Ba).*

²*Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Via E. Orabona, 4, 70124 Bari.*

Summary

The aim of the study was to assess the role played by *Dermanyssus gallinae* in the diffusion of *Salmonella enterica* ser. Gallinarum in intensive poultry farms. The investigation was carried out in a laying hen farm, infested by *D. gallinae*, during an outbreak of fowl typhoid. Mites were collected along two subsequent productive cycles and during the sanitary break. Mites were harvested from 12 different positions in the shed and overall 14 samplings were performed. DNA extraction was carried out from each aliquot and the presence and quantification of *S. Gallinarum* was assessed by using a Seminested-PCR protocol previously validated and Real Time PCR, both proved to be highly specific and sensitive. Results highlighted that, during the outbreak, *S. Gallinarum* was constantly present in mites, as all sampling resulted positive. Similarly, one sample collected during the sanitary break was positive by snPCR, despite the shed had been washed and disinfected. The samples of *D. gallinae* from the second productive cycle were positive as well. However, fowl typhoid was not observed among the animals, probably due to prophylactic measures which comprehended an enhanced vaccination program. These data strongly suggest that *D. gallinae* may act as vector and reservoir of *S. Gallinarum*, thus contributing to the spread of the pathogen between subsequent productive cycles.

INTRODUZIONE

L'acaro rosso del pollame, *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778), è il più diffuso ectoparassita del pollame, in Europa (George *et al.*, 2015) ed in molti paesi extra-europei (Wang *et al.*, 2010, Sparagano *et al.*, 2009 Roy and Buronfosse, 2011). La presenza del *D. gallinae* negli allevamenti può avere gravi ripercussioni sulla salute e la produttività degli animali. Nei gruppi infestati si osservano fenomeni di cannibalismo, una diminuzione del tasso di crescita degli animali e perfino un aumento della mortalità in caso di massiva infestazione (Sparagano *et al.*, 2014). Si possono evidenziare, inoltre, gravi ripercussioni sulla qualità delle uova, con riduzione dello spessore del guscio, e calo del peso. Nel complesso, l'infestazione, pertanto, ha un significativo impatto economico per gli allevatori, ulteriormente aggravato dai costi da sostenere per attuare i trattamenti e le misure di controllo contro la diffusione incontrollata degli acari (Sparagano *et al.*, 2009).

All'azione esercitata direttamente dall'acaro, aggiunge il potenziale ruolo di vettore che *Dermanyssus gallinae* può rivestire nella trasmissione di alcuni agenti patogeni (Valiente Moro *et al.*, 2005), sia batterici che virali, come Newcastle disease virus, *Pasteurella multocida*, *Coxiella burnetii*, *Listeria Monocytogenes* (Valiente Moro

et al., 2009), *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Chirico *et al.*, 2003) and *Chlamydia psittaci* (Circella *et al.*, 2011).

Valiente Moro *et al.* (2007b) hanno anche evidenziato che l'acaro può trasmettere *Salmonella* Enteritidis, se assunto per via orale dal pulcino.

S. enterica supsp. *enterica* serovar Gallinarum (*S. Gallinarum*), invece, sembra sopravvivere all'interno di *D. gallinae* fino a quattro mesi (Zeman *et al.*, 1982).

S. Gallinarum è l'agente etiologico della tifosi aviare, una malattia setticemica acuta o cronica, che generalmente colpisce galline adulte ed altri uccelli (Shivaprasad and Barrow, 2008; Barrow and Neto, 2011). È una malattia diffusa in tutto il mondo (Shivaprasad and Barrow, 2008), caratterizzata da alta morbilità e mortalità in fase acuta o subacuta (Davies, 2012). La tifosi aviare è stata dichiarata eradicata nella maggior parte delle nazioni occidentali (Davies, 2012), ma diversi focolai si registrano ancora lungo il bacino del Mar Mediterraneo e nelle nazioni in cui le misure di controllo sono poco efficienti e le condizioni ambientali ne favoriscono la diffusione (Barrow and Neto, 2011). Il controllo della malattia è ulteriormente complicato dalla modalità di trasmissione del batterio, che può avvenire sia per via verticale che orizzontale (Paiva *et al.*, 2009; Cox *et al.*, 1996), ed anche a causa della contaminazione della lettiera e dell'acqua di bevanda (Shivaprasad and Barrow, 2008). L'eliminazione del germe dall'allevamento è particolarmente difficile in quanto il patogeno sembra permanere nell'allevamento anche durante il periodo di vuoto sanitario. Questo potrebbe essere legato ad alcuni fattori, biotici o abiotici che potrebbero fungere da *reservoir* di infezione. Non è ben chiaro se *D. gallinae* possa effettivamente giocare tale ruolo. Infatti, se è vero che, come precedentemente riportato, la sopravvivenza *in vitro* di *S. Gallinarum* in associazione con *D. gallinae* è stata accertata (Zeman *et al.*, 1982), non sono ancora disponibili dati che confermino tale condizione in campo.

Il presente lavoro è stato pertanto finalizzato a verificare in allevamento se in corso di focolaio di Tifosi aviare, *D. gallinae* possa favorire la persistenza e la diffusione del germe tra due diversi cicli produttivi.

MATERIALI E METODI

Descrizione dell'allevamento e del focolaio

Le analisi sono state condotte in un periodo compreso tra gennaio 2013 e novembre 2014 in un allevamento industriale per la produzione di uova da consumo della Puglia. Quando lo studio è stato avviato, nell'allevamento era in corso un focolaio di tifosi aviare, che ha fatto registrare una mortalità media del 22%. Contemporaneamente, in azienda era presente una massiva infestazione da *D. gallinae*. Considerata la gravità della malattia e le difficoltà connesse con il suo controllo, l'allevatore allontanava gli animali a 10 mesi di deposizione, durante la terza settimana di agosto 2013 ed istituiva un periodo di vuoto sanitario di 60 giorni prima di provvedere all'accasamento del gruppo successivo.

La rimonta è stata effettuata con un gruppo di 22.000 ovaiole, ibrido Hy-line.

Il gruppo, fino all'età di 120 giorni è stato allevato in una pulcinaia negativa per *S. Gallinarum*, la quale non aveva alcun contatto né di personale né di attrezzature con quello di destinazione. Gli animali sono stati sottoposti a vaccinazione con Bio-Vac SGP695 a 30, 60 e 90 giorni di vita prima dell'accasamento e monitorati per la presenza di *S. Gallinarum* prima di essere trasportate nell'allevamento di destinazione.

Campionamento

Gli acari sono stati raccolti durante il focolaio di malattia, il vuoto sanitario e durante il ciclo di produzione successivo, ad intervalli di tempo medi di 45 giorni. Per raccogliere gli acari sono state utilizzate trappole di cartone (Mul *et al.*, 2009) posizionate a vari livelli in almeno 12 punti del capannone (3 per ogni fila). Le trappole sono state poste sulla gabbia e lasciate in situ per 7 giorni prima di essere rimosse. In totale sono stati realizzati 14 campionamenti. Gli acari recuperati dalle trappole, dopo ciascun campionamento sono stati unificati. Da ciascun gruppo sono state allestite 2 aliquote da cento acari ciascuna da sottoporre agli esami molecolari come di seguito riportato.

Estrazione di DNA e seminested PCR

A partire da due aliquote per campionamento, il DNA totale è stato estratto mediante kit commerciale PureLink Genomic DNA Kit (Life Technologies, Milano), ed il DNA ottenuto è stato quantificato mediante misurazione della densità ottica a 260 nm.

La rilevazione di *S. Gallinarum* dai campioni di *D. gallinae* è stata condotta mediante Seminested-PCR (snPCR) come descritto da Pugliese *et al.* (2011). I prodotti dei cicli di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Real Time PCR

La quantità di DNA di *S. Gallinarum* presente negli estratti da acari è stata determinata mediante Real Time PCR (qPCR).

I primer sono stati disegnati sulla base di una regione unica e non ripetuta caratterizzante il genoma di *S. Gallinarum* (Thomson *et al.*, 2008), e precedentemente riconosciuta essere specifica e discriminante (Pugliese *et al.*, 2011). Per garantire una maggiore specificità, come reporter è stata utilizzata una sonda interna all'amplificato. La reazione è stata condotta in un volume finale di 10 μ L, con 1X SsoFast™ Probes Supermix with ROX (Biorad, Milano), 100 nM di ciascun primer (RTSGf e RTSGr) e 400 nM di sonda. A ciascun campione è stato aggiunto 1 μ L di campione di DNA. Ciascuna reazione è stata condotta in triplicato e per ogni esperimento sono state allestite tre reazioni con acqua distillata da usare come controllo negativo.

Tutte le reazioni sono state condotte su piattaforma ABI 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies, Milano). I dati sono stati poi analizzati con il Sequence Detection Software versione 1.2.3 (Life Technologies), con l'impostazione automatica del ciclo soglia (Ct). Per la costruzione della retta di taratura, è stato utilizzata un'aliquota di DNA estratto da coltura pura di *S. Gallinarum* come sopra descritto, che, a sua volta è stato diluito per avere sette concentrazioni scalari.

La quantità relativa di DNA di *S. Gallinarum* presente in ciascun campione è stata determinata mediante il rapporto tra media delle quantità di DNA di *S. Gallinarum* e la quantità di DNA totale.

RISULTATI

In tabella 1 sono riepilogati la quantità relativa di DNA di *S. Gallinarum* (rqSGD) per campione ed i risultati delle snPCR, in relazione alla situazione dell'allevamento.

Tabella 1. Presenza e quantità relativa di DNA di *S. Gallinarum* nei campioni di acaro.

Tempo	rqSGD	Log ₁₀ (rqSGD)	SN-PCR	Situazione dell'allevamento
T ₁	1,88E-04	-3,73E+00	Positivo	Focolaio
T ₂	5,26E-04	-3,28E+00	Positivo	
T ₃	2,59E-06	-5,59E+00	Positivo	
T ₄	3,93E-06	-5,41E+00	Positivo	
T ₅	2,01E-06	-5,70E+00	Positivo	
T ₆	Non rilevabile	/	Positivo	Vuoto sanitario
T ₇	Non rilevabile	/	Negativo	
T ₈	2,28E-08	-7,64E+00	Positivo	Accasamento e nuovo ciclo
T ₉	3,81E-07	-6,42E+00	Positivo	
T ₁₀	3,23E-07	-6,49E+00	Positivo	
T ₁₁	Non rilevabile	/	Negativo	
T ₁₂	Non rilevabile	/	Negativo	
T ₁₃	7,86E-07	-6,10E+00	Positivo	
T ₁₄	5,77E-06	-5,24E+00	Positivo	

Il DNA di *S. Gallinarum* è stato riscontrato negli acari di quasi tutti i campioni analizzati. Le due metodiche impiegate hanno fornito risultati sovrapponibili ad eccezione del campionamento a T₆ in cui la snPCR rivelava una positività che invece non era confermata dalla qPCR.

La Fig. 1 mostra l'andamento della rqSGD nel corso del tempo. Durante la fase acuta del focolaio (T₁ e T₂) la rqSGD è stata di circa due ordini di grandezza (10⁻⁴) più alta, rispetto alla fase avanzata (T₃, T₄, T₅). Il DNA di *S. Gallinarum* non è stato invece quantificabile durante il vuoto sanitario, anche se la snPCR condotta sul campione prelevato a T₆ ha dato esito positivo. Valori bassi ma rilevabili di DNA di *S. Gallinarum* sono stati determinati a partire dai campioni di acaro raccolti nei primi mesi del nuovo ciclo produttivo (T₈, T₉ e T₁₀). Al contrario, le qPCR e le snPCR condotte sui campioni prelevati a T₁₁ e T₁₂ sono risultate entrambe negative, per poi tornare ad essere tutte positive a T₁₃ e T₁₄, con una rqSGD compresa tra 10⁻⁷ e 10⁻⁶.

Nessun sintomo clinico e mortalità riconducibili a Tifosi aviare sono stati osservati sulle ovaiole dopo la rimonta.

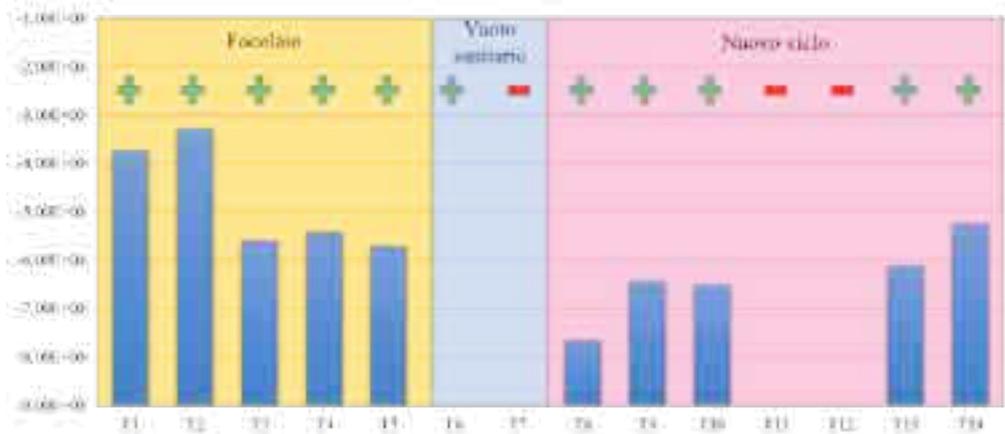


Figura 1. Grafico del Log₁₀ delle concentrazioni medie di *S. Gallinarum* ai diversi tempi di prelievo. I segni positivo e negativo indicano, rispettivamente, la positività o negatività dei campioni a *S. Gallinarum* ottenuta mediante Seminested-PCR.

DISCUSSIONE

I dati ottenuti confermano che *S. Gallinarum* può infettare *D. gallinae*. Infatti, il DNA del germe si ritrova associato all'acaro durante il focolaio d'infezione, durante il successivo vuoto sanitario e nel nuovo ciclo produttivo. È possibile ipotizzare che la quantità di *S. Gallinarum* associata all'acaro sia direttamente correlata con il livello di circolazione del batterio nell'allevamento. La rqSGD è maggiore durante la fase acuta del focolaio per poi calare successivamente, quando la malattia tende a divenire endemica.

Particolarmente interessanti sono i dati ottenuti durante il vuoto sanitario. Infatti, alcune aliquote di acari hanno dato esito positivo in snPCR e negativo in qPCR, probabilmente a causa della maggiore sensibilità della prima rispetto alla seconda (Bastien *et al.*, 2008).

Il dati che scaturiscono dal questo lavoro dimostrano che *D. gallinae* può infettarsi con *S. Gallinarum*, e consentire la persistenza della stessa all'interno della popolazione di artropodi ed in allevamento per l'intera durata del ciclo di produzione.

Sugli acari *Salmonella* sopravvive durante il vuoto sanitario, quando in allevamento sono effettuate stringenti azioni di pulizia, disinfezione e disinfestazione delle gabbie e degli ambienti. Nella prova oggetto di questo lavoro, *D. gallinae*, durante il vuoto sanitario erano nascosti nei posatoi, dove potevano sfuggire all'azione dei trattamenti operati durante le fasi di pulizia. È noto che l'acaro si nasconde negli anfratti e nelle crepe dei pavimenti e dei muri tra un ciclo produttivo e l'altro (Sparagano *et al.*, 2014). La sopravvivenza di acari infetti può ovviamente consentire il mantenimento dell'infezione nell'ambiente e garantire il passaggio sugli animali, che in condizioni predisponenti potrebbero tornare a presentare la malattia.

Nella prova effettuata, successivamente all'accasamento del nuovo gruppo di ovaiole la rqSGD rileva un aumento della quantità di DNA nella popolazione di acari. È plausibile pensare che esso sia riconducibile ad una ripresa della circolazione del germe all'interno del gruppo di animali.

Non è escluso, inoltre, che *Salmonella* possa moltiplicarsi all'interno degli acari, come ipotizzato da Valiente Moro *et al.* (2007a) per *Salmonella* Enteritidis. Ovviamente, per accertare il ruolo di serbatoio di *D. gallinae* sono necessari ulteriori approfondimenti.

Interventi straordinari di profilassi vaccinale nei confronti di *S. gallinarum* (dati non riportati) hanno probabilmente contribuito a T_{11} e T_{12} a ridurre la circolazione del germe a livelli non rilevabili dalla snPCR e qPCR. La carica di *S. Gallinarum* è comunque di nuovo aumentata via via che il ciclo produttivo volgeva verso la parte finale.

Nel complesso, i dati ottenuti da questo trial di campo dimostrano il ruolo di vettore giocato di *D. gallinae* durante il ciclo di produzione, e la stretta associazione che vi è tra acaro e *Salmonella* Gallinarum.

In un quadro più generale, il controllo e soprattutto l'eradicazione delle popolazioni di *Dermanyssus* dagli allevamenti devono rappresentare un obiettivo primario nella strategia di protezione degli animali non solo ai fini del contenimento delle perdite economiche indotte dall'acaro, ma anche per il controllo della diffusione delle malattie infettive all'interno dei gruppi in attività.

CONCLUSIONI

Il potenziale ruolo di *D. gallinae* come vettore e *reservoir* di *S. Gallinarum*, è un problema di notevole importanza. Alla luce dei risultati ottenuti, l'acaro rosso sembra contribuire in modo decisivo alla perpetuazione della Tifosi all'interno dell'allevamento tra un ciclo produttivo e l'altro e garantire la persistenza del germe all'interno del ciclo produttivo.

La messa a punto di strategie di profilassi diretta ed indiretta volte al contenimento contestuale dell'infezione e dell'infestazione rappresentano un momento imprescindibile nella lotta contro la Tifosi aviare.

BIBLIOGRAFIA

1. Barrow PA and Freitas Neto OC. (2011). Pullorum disease and fowl typhoid - new thoughts on old diseases: a review, *Avian Pathology*, 40:1, 1-13.
2. Bastien P, Procop GW and Reischl U. (2008). Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J. Clin. Microbiol.* 46:1897- 1900.
3. Chirico J, Eriksson H, Fossum O and 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.
4. Circella E, Pugliese N, Todisco G, Cafiero MA, Sparagano OAE and Camarda A. (2011). *Chlamydia psittaci* infection in canaries heavily infested by *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology*, 55, 329-338.
5. Cox NA, Bailey JS and Berrang ME. (1996). Extent of *Salmonellae* contamination in breeder hatcheries, *Poultry Science*, Champaign, 70: 416-418.
6. Davies R. (2012). Fowl Typhoid and Pullorum Disease, OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2012, Chapter 2 .3 .11. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris.
7. George DR, Finn RD, Graham KM, Mul MF, Maurer V, Valiente Moro CV and Sparagano, OAE. (2015). Should the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* be of wider concern for veterinary and medical science? *Parasites & Vectors*, 8, 178.

8. Mul M, Van Niekerk T, Chirico J, Maurer V, O. Kilpinen O, Sparagano O, Thind B, Zoons J, Moore D, Bell B, Gjevre AG and Chauve C. (2009). Control methods for *Dermanyssus gallinae* in systems of laying hens. Results of an international seminar. *World Poult Sci J* 65:589–598.
9. Paiva, JB, Penha F, Anguello YMS, Siva MD, Gardin Y, Resende F, Berchieri A and Sestsi L. (2009). Efficacy 25 of several *Salmonella* vaccination programme against experimental challenge with *Salmonella Gallinarum* in commercial brown breeder hens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 11(1): 65-72.
10. 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* serovar *Gallinarum*. *J. Microbiol Methods*. 85, 22–27.
11. Roy L and Buronfosse T. (2011). Using mitochondrial and nuclear sequence data for disentangling population structure in complex pest species: a case study with *Dermanyssus gallinae*. *Plos One*, 6, e22305.
12. Shivaprasad HL and Barrow PA. (2008). Pullorum disease and fowl typhoid. In Y.M Saif, A.M. Fadly, J.R Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan & D.E Swayne (Eds.). *Diseases of Poultry 12th edn* (pp. 620_634). Ames: Iowa State Press.
13. Sparagano O, 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. *Experimental and Applied Acarology*, 48, 3-10.
14. Sparagano OAE, George DR, Harrington DWJ and Giangaspero A. (2014). Significance and control of the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annual Review of Entomology*, 59, 447-466.
15. Thomson NR, Clayton DJ, Windhorst D, Vernikos G, Davidson S, Churcher C, Quail MA, Stevens M, Jones MA, Watson M, Barron A, Layton A, Pickard D, Kingsley RA, Bignell A, Clark L, Harris B, Ormond D, Abdellah Z, Brooks K, Cherevach I, Chillingworth T, Woodward J, Norberczak H, Lord A, Arrowsmith C, Jagels K, Moule S, Mungall K, Sanders M, Whitehead S, Chabalgoity JA, Maskell D, Humphrey T, Roberts M, Barrow PA, Dougan G and Parkhill J. (2008). Comparative genome analysis of *Salmonella Enteritidis* PT4 and *Salmonella Gallinarum* 287/91 provides insights into evolutionary and host adaptation pathways. *Genome Res*. 18, 1624–1637.
16. Valiente Moro C, Chauve C and Zenner L. (2005). Vectorial role of some dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssoidea). *Parasite*, 12, 99-109.
17. Valiente Moro C, Chauve C, Zenner L. (2007a). Experimental infection of *Salmonella enteritidis* by the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Vet Parasitol* 146:329–336.
18. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OAE and Zenner L. (2009b). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Experimental and Applied Acarology*, 48, 93-104.
19. Wang FF, Wang M, Xu FR, Liang DM and Pan BL. (2010). Survey of prevalence and control of ectoparasites in caged poultry in China. *Veterinary Record*, 167, 934-937.
20. 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*, 29, 371-374.