

EFFICACIA DI RP03® PER IL CONTROLLO DELLE INFESTAZIONI DA *DERMANYSSUS GALLINAE* IN ALLEVAMENTI AVICOLI

Cocciolo G.¹, Circella E.¹, Giangaspero A.², Bevilacqua A.², Gradoni L.³, Previtera I.¹, Camarda A.¹

¹Dipartimento di Medicina Veterinaria, Sezione di Patologia aviare, Università degli Studi di Bari “Aldo Moro”

²Departmento di Scienze Agrarie, Alimenti e Ambiente, Università di Foggia

³Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

Summary

The Poultry Red Mite *Dermanyssus gallinae* is a major issue in laying hen flocks all over the world because of its effects on animals (stress, declining production), on the quality of eggs (spots of blood) and because of its economic impact for its control. Several drugs proved to be effective against the mite. However, the appearance of a resistance, the difficulty in finding products to be used during the production cycle, and the risk that residues could be retrieved in avian products (meat and eggs), led the scientific community to seek alternative and natural products, which might be efficient and safe.

Among these, Neem oil seems to be an excellent candidate for the use in field.

The purpose of this work was to verify the effectiveness of RP03®, a natural product Neem oil based, against *D. gallinae* in an intensive laying hen flock for the production of eggs for consumption. The study has been carried out in a shed, ranking a level 4 of infestation according the classification of Cox et al., (2009).

The formulation of Neem oil (RP03®), containing Azadirachtin 2400 p.p.m. was administered by nebulization three times in a week.

The population density before and after treatments was monitored by collecting the mites through corrugated cardboard traps placed inside a rigid plastic sheath, attached to the outside of the cages. Mites in the traps were inactivated by freezing and their number was estimated through the evaluation of their total weight.

The monitoring of the population of *D. gallinae* was extended to the row immediately adjacent to the one treated (buffer) and to the row on the opposite side (control).

The treatment with RP03® caused, in the treated row, the reduction in the mite population of 94.65%, 99.64% and 99.80% after the first, second and third administration, respectively, and of 99.54% at the end of the observation period after 162 days.

After the third treatment, a reduction of 82% and 83.7% was observed also in the control and buffer row, respectively. This was probably due to the dispersion of the product inside the shed, after the activation of the extractors used for air exchange.

In conclusion, the results of this study seem to demonstrate the effectiveness of RP03®-neem oil based solution in the control of *D. gallinae* in poultry flocks of laying hens in cages.

Thanks to the low level of toxicity of the active ingredient, and to the absence of residues in products of avian origin, it could be safely used for the control of poultry red mite in field. Further studies should be addressed to overcome some undesired effects observed on poultry equipment and eggs, such as the persistence of an oily film few days post treatment.

INTRODUZIONE

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1778), è considerato il più importante ectoparassita del pollame in Europa. Diffuso principalmente negli allevamenti di galline ovaiole, si stima possa raggiungere percentuali di infestazione anche del 90% (Sparagano et al. 2009). La sua presenza in allevamento provoca un gravissimo stress agli animali, grave anemia aumento della mortalità, e un impatto negativo sulla produzione delle uova (Kilpinen et al., 2005; Cosoroaba, 2001). Non è infine da sottovalutare il ruolo dell'acaro quale di potenziale vettore e serbatoio di malattie infettive (Valiente-Moro et al., 2009).

Il controllo del *Dermanyssus gallinae* è particolarmente complesso, e spesso affidato a molecole di sintesi quali carbamati, organofosforici e piretrine che non sempre raggiungono i risultati sperati. Il loro prolungato utilizzo, infatti, può portare ad una riduzione di efficacia imputabile spesso allo sviluppo di popolazioni di acari resistenti (Chauve 1998). Non va sottaciuto infine, il rischio che l'uso improprio di farmaci di sintesi possa portare all'introduzione sul mercato di prodotti alimentari contenenti residui di farmaci che potrebbero avere potenziali ripercussioni sulla salute dell'uomo (Marangi et al, 2012).

Ci si è pertanto orientati sempre di più verso la ricerca di strategie di controllo alternative (Marangi et al., 2009), più efficaci, che contemplino, tra le altre cose, anche l'impiego di molecole di origine naturale, in grado di coniugare efficacia e scarsa tossicità per animali ed uomo (George et al., 2008 a, b; Maurer et al., 2009).

Tra queste, soluzioni a base di olio di Neem hanno dimostrato una certa efficacia contro una vasta gamma di parassiti, insetti e artropodi ematofagi, (Alzohairy, 2016), L'estratto di Neem deve la sua efficacia a numerosi principi attivi, ed in particolare all'Azadiractina, che agisce principalmente bloccando l'ormone della crescita nei giovani insetti, interviene sulla riproduzione e interrompe la sintesi della chitina (Mordue and Nisbet, 2000).

Nonostante sia già in commercio un prodotto a base di olio di Neem (MiteStop^R) le ricerche scientifiche riguardanti l'efficacia del Neem su *Dermanyssus gallinae* in campo sono molto scarse.

Si è inteso pertanto valutare in un allevamento di galline ovaiole l'efficacia di un prodotto a base di olio di Neem (RP03[®]) in un allevamento industriale di galline ovaiole caratterizzato alti livelli di infestazione da *Dermanyssus gallinae*.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta tra settembre 2016 e febbraio 2017 in un allevamento industriale di galline ovaiole in gabbie arricchite situato in provincia di Brindisi, Puglia.

Il capannone in cui è stata eseguita la prova aveva una lunghezza di 75 metri ed una larghezza 12,5 metri. La ventilazione era forzata a pressione negativa, a regolazione elettronica. Il capannone, inoltre, era dotato di un impianto di condizionamento ad acqua del tipo pad-cooling.

In totale, i capi allevati erano 19.000, omogeneamente distribuiti in 4 file, ciascuna dotata di 2 lati e 4 piani. In ogni fila erano presenti 59 gabbie di 1,10 metri di lunghezza ciascuna. In ogni gabbia erano accasati 20 capi per un totale di 4750 ovaiole per ciascuna fila.

Gli animali erano alimentati *ad libitum* con un mangime commerciale.

Non sono stati effettuati trattamenti con acaricidi nei tre mesi precedenti alla sperimentazione. Quest'ultima è stata condotta secondo le linee guida universali sul benessere animale.

Trattamento con RP03®

Per la prova è stato utilizzato RP03®, una soluzione contenente olio di Neem, diluito al 20% in acqua e coformulanti (concentrazione totale di Azadiractina 2400 p.p.m.) somministrato per spray.

In totale per ciascun trattamento sono stati utilizzati 150 Litri di soluzione, pari a 0,32 litri per m².

Il trattamento è stato effettuato per tre volte a distanza di 3 giorni l'uno dall'altro (T₀, T₃ e T₇).

Durante il trattamento, al fine di consentire una omogenea solubilizzazione del prodotto la soluzione è stata mantenuta in agitazione permanente.

La sperimentazione è stata condotta su 3 delle 4 file di gabbie presenti nel capannone. In particolare la fila 1, quella più distante dalla fila trattata, è stata mantenuta come "controllo negativo", la fila 3, "buffer", adiacente alla fila trattata, è stata monitorata per verificare un eventuale effetto sugli acari dovuto alla dispersione dell'RP03® mentre la fila 4 è stata sottoposta al trattamento acaricida. La fila 2 non è stata né trattata né monitorata.

Monitoraggio

Al momento in cui la sperimentazione è stata avviata, il livello d'infestazione stimato del capannone era pari a "IV" secondo la scala di Cox et al. (2009).

Prima di procedere al trattamento è stata effettuata una stima della popolazione di acari mediante posizionamento di trappole in cartone corrugato delle dimensioni di 100 x 140 mm e di 3 mm di spessore (Nordenfors et al., 1999). Il cartone veniva arrotolato ed inserito in una guaina di plastica rigida di pari lunghezza che era fissata all'esterno delle gabbie.

Al fine di ottenere una stima omogenea della popolazione presente in ciascuna fila, si è scelto di posizionare le trappole ad altezze differenti per ciascun lato. In totale, per ciascun lato sono state posizionate 20 trappole, 40 per ogni fila e 120 in totale per ogni ciclo di monitoraggio.

Le trappole venivano mantenute *in situ* per 72 ore prima di essere rimosse e poste in buste sigillate che sono state inviate al laboratorio per la lettura.

Per il monitoraggio della popolazione di acari le trappole sono state posizionate a T₋₄, T₀, T₃, T₇, T₁₀, T₁₈, T₂₇, T₃₄, T₄₁, T₅₀, T₅₉, T₆₉, T₈₇ e T₁₆₂ dopo il primo trattamento.

Le trappole ritirate dai contenitori in plastica sono state poste in buste in plastica sterili singole, e quindi inviate in laboratorio. Qui sono state poste in congelatore e mantenute per 48 ore al fine di ottenere l'inattivazione degli acari.

La lettura è stata effettuata "in cieco". Gli acari sono stati posti in piastra Petri e identificati secondo le chiavi morfologiche di Moss (1968) e Di Palma et al. (2012). La conta è stata effettuata allo stereomicroscopio. Quando il numero di acari superava 500 la lettura è stata effettuata mediante pesatura. La calibrazione sulla quale effettuare il calcolo è stata eseguita valutando il peso di almeno 5 aliquote da 100 acari ciascuna.

Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, U.S.A.) sui dati scaturiti dalle conte e trasformati in logaritmo.

La distribuzione della popolazione iniziale di *Dermanyssus* è stata valutata attraverso il test di Shapiro-Wilk.

La riduzione della popolazione di acari nel tempo è stata analizzata mediante il test di distribuzione di Weibull, come riportato da Geeraerd et al, 2005.

RISULTATI

Il livello di infestazione, calcolato prima del trattamento, ha consentito di stabilire che la popolazione media per trappola nelle tre file, era pari a 48.284 ± 15.864 , 9.594 ± 7.430 , e 3.049 ± 4.689 rispettivamente, nelle file controllo (1), buffer (3) e trattata (4).

A seguito del primo trattamento è stata osservata una riduzione media degli acari pari a 0,44, 0,40 e 1,27 Log rispettivamente nelle file controllo, buffer e trattata, mentre dopo il terzo trattamento il calo registrato rispetto al T_0 era di 0,74, 0,78 e 2,71 Log, evidenziando, pertanto un maggiore e significativo abbattimento della popolazione di acari nella fila trattata rispetto alle altre due.

Dodici giorni dopo il primo trattamento, nella fila trattata e in quella di controllo si osservava un incremento medio rispettivamente di 0,30 e 0,22 Log rispetto al valore registrato otto giorni prima, significativo in entrambi i casi ($P = 0,0385$ e $P = 0,0007$), mentre nella fila buffer non si osservavano oscillazioni statisticamente significative. Tuttavia, va sottolineato che il numero complessivo di acari registrato a partire dalla fila trattata rimaneva molto basso (12 ± 15) rispetto a quello della fila di controllo ($14,388 \pm 8,234$).

Al giorno 59 della sperimentazione, 53 dall'ultimo trattamento, il numero di acari rilevato nella fila trattata rimaneva molto basso (5 ± 4), contro i 188 ± 207 e 2.643 ± 2.529 delle fila buffer e controllo.

Considerando gli ultimi due punti di controllo, relativi al giorno 69 e al giorno 162 dall'inizio della sperimentazione (63 e 152 dall'ultimo trattamento), si registrava un aumento del numero medio degli acari in tutte e tre le file. Nella fila trattata, al giorno 162 l'aumento medio era di 0,26 Log rispetto al giorno 59 con una significatività statistica di $P = 0,049$, che portava il numero medio di acari per trappola a 9 ± 12 . L'incremento medio è stato molto più marcato nella fila buffer (1,22 Log) e statisticamente significativo ($P = 0,0006$), e lo stesso è stato osservato per la fila di controllo (0,52 Log; $P < 0,0001$). Dopo 162 giorni, gli acari nella fila trattata erano circa 1000 volte meno rispetto alla fila di controllo, e circa 200 volte meno rispetto alla fila buffer.

DISCUSSIONE

Il trial condotto dimostra la capacità di RP03® di abbattere la popolazione di *Dermanyssus gallinae* quando somministrato per via spray in un allevamento di galline ovaiole.

Nella sperimentazione descritta si è inoltre ottenuta una riduzione significativa della consistenza della popolazione di acari che si è protratta per l'intero periodo di osservazione.

Al momento del trattamento vi era nel capannone una distribuzione di acari disomogenea nelle diverse file. Infatti, il numero medio di acari nelle trappole della fila 1 e 3 era superiore a quella della fila 4 rispettivamente di oltre 10 e 3 volte.

I motivi che hanno potuto portare a tale situazione, già nota nella pratica di campo, sono vari e non sempre facilmente individuabili. Ad esempio, le condizioni microclimatiche (temperatura, umidità, concentrazione di alcuni gas) del capannone possono aver favorito in alcuni punti una maggiore o minore proliferazione degli acari (Maurer and Baumgärtner, 1992; Koziatek and Sokol, 2015; Nordenfors et al., 1999; Nordenfors and Hoglund, 2000). Tuttavia, la normalizzazione dei dati, effettuata per sottoporre ad analisi statistica i risultati, ha consentito valutazioni oggettive circa l'efficacia mostrata da RP03® nei confronti del *Dermanyssus gallinae*. Già dopo il primo trattamento, è stato osservato nella popolazione trattata, un calo del numero medio degli acari ben superiore al 90%. Il calo è superiore al 99% nella fila trattata dopo il secondo ed il terzo trattamento. L'efficacia dell'azione acaricida si è infine mantenuta per l'intero periodo di osservazione. Questo risultato, notevolmente superiore a quello della fila controllo e buffer potrebbe essere ascrivibile al meccanismo di azione dell'Azadiractina che esplicherebbe la sua attività acaricida non solo sugli adulti ma anche su stadi intermedi e larve (Abdel-Ghaffar et al., 2008).

La riduzione della popolazione di acari si è estesa anche alla file buffer e controllo. Tale riduzione potrebbe essere imputata ad una dispersione dell'RP03® nel capannone favorita dall'attivazione dell'impianto di ventilazione.

Nella fila buffer la popolazione ha continuato a calare fino alla fine del periodo di osservazione, mentre nella fila controllo si è assistito ad una ripresa dello sviluppo nel numero degli acari.

È possibile che il calo continuo del numero di acari nella fila buffer fosse da attribuire ad un'attività residuale del prodotto utilizzato, verificatosi a causa della vicinanza con la fila trattata.

Il trattamento non ha determinato negli animali la comparsa di alcuna sintomatologia clinica e l'allevatore non ha mai segnalato alcun impatto negativo sulla deposizione o sulla qualità delle uova per l'intero periodo di osservazione.

Unico inconveniente da segnalare è stata la formazione di un film oleoso su strutture (gabbie, nastro trasportatore delle uova) e pavimento che si è mantenuto per alcuni giorni. Nelle prime 24 ore dopo il trattamento, inoltre, si segnala l'imbrattamento di alcune uova con la soluzione di RP03® raccoltasi in eccesso in alcuni punti del nastro convogliatore che, però si è risolto nel giro di 24/36 ore. Nel capannone, infine, l'allevatore ha segnalato per alcuni giorni dopo il trattamento, la persistenza di un odore caratteristico che però non sembra essersi trasferito alle uova.

CONCLUSIONI

Questo studio dimostra l'efficacia di RP03® nei confronti di *Dermanyssus gallinae*. L'impiego di molecole di origine naturale come strumento per il trattamento delle infestazioni indotte da questi acari sarebbe auspicabile, ed è fortemente richiesto dal mercato, preoccupato dalle notizie di stampa che riportano della presenza di residui di molecole proibite nelle uova e nei prodotti da esse derivati. Ulteriori trial di campo sono necessari per superare gli inconvenienti riscontrati durante la sperimentazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdel-Ghaffar F, Sobhy HM, Al-Quraishy S, Semmler M. (2008). Field study on the efficacy of an extract of neem seed (Mite-Stop®) against the red mite *Dermanyssus gallinae* naturally infecting poultry in Egypt. *Parasitol Res.* 103:481–485.
2. Alzohairy MA. (2016). Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016 1; 2016:7382506.
3. Chauve C. (1998). The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Veterinary Parasitology* 79: 239-245.
4. Cosoroaba I. (2001). Massive *Dermanyssus gallinae* (De Geer 1778) invasion in battery-husbandry raised fowls in Romania [egg-laying decrease, mortality]. *Rev.Med.Vet.* (France).
5. Cox M, De Baere K, Vervae E, Zoons J, Fiks-Van Niekerk T. (2009). Red mites: monitoring method and treatment. In: *Book of Abstracts 8th European symposium on poultry welfare*, Cervia, Italy, 18–22 May, p 8.
6. Di Palma A., Giangaspero A. Cafiero M.A., & Germinara G.S. (2012). A gallery of the key characters to ease identification of *Dermanyssus Gallinae* (Acari: Gamasida: Dermanyssidae) and allow differentiation from *Ornithonyssus sylviarum* (Acari: Gamasida: Macronyssidae). *Parasites and vector*, 5, 104.
7. Geeraerd A.H., Valdramidis, VP and van Ompe JF. (2005) GInaFIT, a freeware tool to asses non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of food Microbiology.* 102, 95-105.
8. George D, Calaghan K, Guy JH, Sparagano OAE. (2008a). Lack of prolonged activity of lavender essential oils as acaricides against the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*) under laboratory conditions. *Research in Veterinary Science* 85(3): 540-542.
9. George DR, Smith TJ, Sparagano OAE, Guy JH. (2008b). The influence of ‘time since last blood meal’ on the toxicity of essential oils to the poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*). *Veterinary Parasitology* 155: 333-335.
10. Kilpinen O, Roepstorff A, Permin A, Norgaard-Nielsen G, Lawson LG, Simonson HB. (2005). Influence of *Dermanyssus gallinae* and *Ascaridia galli* infections on behaviour and health of laying hens (*Gallus gallus domesticus*).
11. Koziatek S, Sokół R. (2015). *Dermanyssus gallinae* still poses a serious threat for the rearing of laying hens. *Polish Journal Of Natural Sciences Abbrev.* Pol. J. Natur. Sc. 30(4): 451–463.
12. Marangi M, de Luna CJ, Cafiero MA, Camarda A, le Bouquin S, Huonnic D, Giangaspero A, Sparagano OA. (2009). Phylogenetic relationship between *Dermanyssus gallinae* populations in European countries based on mitochondrial COI gene sequences. *Exp Appl Acarol.* 48(1-2):143-55.
13. Marangi M, Morelli V., Pati S., Camarda A., Cafiero M.A. & Giangaspero A., (2012). Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. *Plos One*, 7, e31795.
14. Maurer V, Baumgartner J. (1992). Temperature influence on life table statistics of the chicken mite *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Experimental & Applied Acarology* 15: 27-40.

15. Maurer V, Perler E, Heckendorn F. (2009). In vitro efficacies of oils, silicas and plant preparations against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Experimental and Applied Acarology* 48: 31- 41.
16. Mordue (Luntz) AJ, Nisbet AJ. (2000). Azadirachtin from the Neem Tree *Azadirachta indica*: its Action Against Insects. *An. Soc. Entomol. Bras.* vol.29 no.4 Londrina.
17. Moss WW (1968). An illustrated key to the species of the acarine genus *Dermanyssus* (Mesostigmatas: Laelapoidea: Dermanyssidae). *Journal of medical entomology*, 5, 67-84.
18. Nordenfors H, Hoglund J, Uggla A. (1999). Effects of temperature and humidity on oviposition, molting and longevity of *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Journal of Medical Entomology* 36: 68-72.
19. 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.
20. Sparagano O., Pavličević A., Murano T., Camarda A., Sahibi H, Kilpinen O., Mul M., van Emous R., le Bouquin S., Hoel K., Cafiero M.A. (2009). Prevalence and key figures for the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* infections in poultry farm systems. *Experimental and Applied Acarology* Volume 48, Issue 1-2, pp 3-10.
21. Valiente Moro C, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OA, Zenner L. (2009). The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. *Exp Appl Acarol.* 48: 93-104.