

RUOLO DI *MUSCA DOMESTICA* COME VETTORE IN UN EPISODIO DI BOTULISMO OSSERVATO IN ALLEVAMENTO COMMERCIALE DI QUAGLIE (*COTURNIX COTURNIX*)

Palazzolo L.¹, Camarda A.², Cordioli B.¹, Cornaggia M.¹, Di Castri A.¹, Drigo I.¹, Rizzardi A.¹, Zarpellon G.¹, Streparola G.³, Viel L.¹, Bano L.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), Vicolo Mazzini 4, 31020, Fontane di Villorba, Treviso;*

²*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, S.P. Casamassima km. 3, 70010 Valenzano, Bari;*

³*Agricola Italiana Alimentare (AIA) S.p.A., Via Valpantena, 18/G, 37142 Quinto di Valpantena, Verona.*

Summary

The present report describes an uncommon avian botulism outbreak caused by BoNT type D/C occurred in a commercial quail flock (*Coturnix coturnix*). The episode occurred in July 2020 in a farm of 40.000 quails. The birds showed neuro-paralytic signs and a mortality rate which reached 30%. No gross lesions were observed and the routine diagnostic examinations for viruses and bacteria resulted negative.

The epidemiological investigation reveals an anomalous high number of flies outside and inside the farm. Some death flies were observed in the drinking cups of symptomatic birds. Drinking water was collected from the central cistern, peripheral tank of the rooms and from the drinking cups in the cages that hosted affected quails. An insecticide was dispersed outside the farm and died flies were collected for BoNT-encoding genes research.

The results from environmental samples revealed the presence of BoNT type D/C in the drinking water collected from the cups and in the flies. Our findings sustain the possible role of the flies (*Musca domestica*) as mechanical vectors for botulism in poultry.

INTRODUZIONE

Il botulismo aviare è una malattia neuro-paralitica che colpisce un ampio numero di specie di uccelli domestici e selvatici. I segni clinici sono caratterizzati da abbattimento, decubito tarsale, riluttanza al movimento, ptosi delle ali e delle palpebre e incapacità di sollevare il capo che, per questo motivo, viene appoggiato sul piano ("limber neck"). Tali sintomi sono dovuti a una paralisi flaccida caudo-craniale che coinvolge i muscoli di arti inferiori, ali, collo e palpebre culminando con la morte dell'animale in seguito ad insufficienza respiratoria dovuta alla paralisi della componente muscolare deputata a tale funzione (Dohms et al., 1982; Blandford & Roberts, 1970; Peck et al., 2017).

L'agente eziologico del botulismo è una neurotossina (BoNT) di cui si riconoscono 7 diversi sierotipi identificati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla H, prodotte da specie appartenenti al genere *Clostridium*: batteri sporigeni Gram positivi anaerobi obbligati (Segner et al., 1971; Oguma et al., 1986). Un tempo si credeva che le BoNTs fossero prodotte da un'unica specie clostridica chiamata *Clostridium botulinum*. Oggi sappiamo che *C. botulinum* è formato da almeno 4 specie diverse che hanno mantenuto

la stessa nomenclatura ma a cui viene assegnato un gruppo diverso identificato con numeri romani (da I a IV). In aggiunta esistono alcuni ceppi di *C. butyricum* e di *C. baratii* in grado di produrre BoNTs rispettivamente di tipo E ed F (Peck et al., 2017). Le BoNTs sono proteine idrosolubili in grado di provocare una sindrome paralitica in molte specie animali e nell'uomo attraverso il clivaggio di un gruppo di proteine definite SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor), coinvolte nel meccanismo del rilascio dell'acetilcolina a livello pre-sinaptico. Il mancato rilascio di acetilcolina ad opera dell'azione enzimatica di BoNT su questo gruppo di proteine, causa la classica paralisi flaccida osservata nei casi di botulismo (Montecucco et al., 1996). Il botulismo umano è sostenuto da BoNT di tipo A, B, E, F mentre quello animale è causato principalmente dai sierotipi C, D e dalle loro forme mosaico D/C e C/D derivanti dal rimodellamento genetico dei fagi che veicolano i geni codificanti le tossine di questi due sierotipi (Anniballi et al 2013; Woudstra et al., 2012). Tali sierotipi derivano da *C. botulinum* gruppo III, oggi chiamato *C. novyi sensu lato*, a cui appartengono anche *C. novyi* e *C. haemolyticum* (Skarin et al., 2011)

In particolare, le BoNTs tipiche del botulismo aviare appartengono ai sierotipi C, C/D, D/C, E, tipica degli uccelli ittiofagi, e raramente A (Bano et al., 2017; Chipault et al. 2015; Circella et al., 2019; Hannett et al., 2011; Souillard et al., 2017; Souillard et al., 2021; Fillo et al., 2021). Il sierotipo più frequentemente implicato in casi di botulismo aviare è il C/D, che risulterebbe più letale rispetto a BoNT C non-mosaico (Takeda et al 2005; Miyazaki & Sakaguchi, 1978; Anza et al., 2014; Bano et al., 2017; Woudstra et al., 2012; Fillo et al., 2021).

La prima segnalazione di BoNT tipo C in insetti raccolti in un focolaio di botulismo aviare è avvenuto in larve di mosca verde (*Lucilia caesar*) che si erano cibate delle carcasse in un allevamento di polli (Bengtson, 1922). In seguito si è visto che le larve di dittero e gli insetti necrofagi giocano un ruolo fondamentale nella patogenesi e nel mantenimento di diversi focolai di botulismo aviare, spiegando anche come uccelli non necrofagi fossero coinvolti in numerosi casi di intossicazione (Duncan & Jensen, 1976; Foreyt & Abinanti, 1980; Hubalek & Halouzka, 1991; Wobeser, 1997).

Anche dalle mosche, prelevate da luoghi prossimi ai focolai di botulismo sono stati isolati Clostridi produttori di BoNT/C e C/D ma fino al 2014 il ruolo delle mosche in focolai di botulismo aviare non era ancora noto (Duncan & Jensen, 1976; Vidal et al., 2013). Anza et al. (2014) riuscirono a dimostrare sperimentalmente, ricreando le condizioni di un focolaio, che era possibile per le mosche trasportare i Clostridi BoNT-produttori per 24 ore, tempo sufficientemente ad alcuni tipi di mosca per percorrere dai 6 ai 32 km.

Il nostro studio riporta un caso di botulismo aviare in un allevamento di quaglie, la cui genesi è plausibilmente da attribuire al ruolo di vettore meccanico della mosca.

MATERIALI E METODI

Nel luglio del 2020, in un allevamento a ciclo chiuso di circa 40000 quaglie (36000 soggetti da carne e 4000 coppie di riproduttori) della provincia di Verona, si segnalava un aumento della mortalità che in poche settimane interessava il 30% dell'effettivo. Gli animali erano stabulati in gabbie poste in batterie di 5 piani, di cui 2 inutilizzati in modo alternato, che occupavano 5 stanze. Le gabbie erano ben separate tra loro impedendo contatti diretti tra gli animali di gabbie adiacenti. I soggetti erano alimentati con mangime commerciale distribuito attraverso coclea in partenza dal silo esterno e per caduta

alle mangiatoie poste in ciascuna gabbia. L'acqua scorreva dalle cisterne di raccolta alle vaschette intermedie, poste in alto in diversi punti all'interno delle stanze di allevamento, per poi arrivare per gravità separatamente ai vari abbeveratoi delle gabbie.

Gli animali colpiti manifestavano una sindrome paralitica di vario grado caratterizzata da ali cadenti, ptosi palpebrale, decubito tarsale e morte di tutti i soggetti sintomatici. La mortalità colpiva tutti i soggetti di una stessa gabbia, mentre i soggetti ospitati nelle gabbie adiacenti potevano non essere colpiti dalla malattia.

Inizialmente le carcasse dei soggetti deceduti erano state conferite a un laboratorio diagnostico privato che escludeva le più comuni cause virali e batteriche di mortalità della quaglia. Lo stesso laboratorio inviava i pacchetti intestinali presso la Sezione Diagnostica di Treviso dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie che confermava la diagnosi di botulismo aviare sostenuto da BoNTs di tipo D/C attraverso procedure di laboratorio precedentemente descritte (Bano et al., 2017).

In seguito alla positività riscontrata si decideva un sopralluogo aziendale congiunto tra personale veterinario dell'IZS e veterinario aziendale al fine di individuare la fonte della tossinfezione o di intossicazione e per condurre un'indagine epidemiologica completa. Inizialmente sono stati prelevati campioni di alimento ed acqua. Quest'ultima è stata prelevata in più punti: cisterna centrale, vasca di stoccaggio presenti nelle singole stanze di allevamento e abbeveratoi.

I campioni d'acqua sono stati sottoposti alla ricerca di tossina botulinica attraverso prova biologica, come previsto dalla procedura del Centro di Referenza per il Botulismo (CNRB 30.012, 2021). Gli stessi campioni d'acqua, quelli d'alimento e i pool di ditteri raccolti negli abbeveratoi sono stati sottoposti alla ricerca di Clostridi produttori di neurotossine. Per i sierotipi A, B, E ed F è stato applicato il protocollo in real-time PCR del CNRB (31.012, 2021) mentre per i tipi C, D e per le forme mosaico sono stati applicati protocolli di PCR precedentemente pubblicati (Franciosa et al., 1996).

RISULTATI

Il sopralluogo aziendale ha evidenziato la presenza di numerosi ditteri (*Musca domestica*) all'interno e all'esterno delle stanze d'allevamento. Molti di questi erano rinvenuti morti al di fuori delle stanze in seguito a trattamenti periodici con antiparassitari indirizzati ad abbatterne la carica, a base di Thiamethoxam (TMX). All'interno delle stanze erano presenti esemplari vivi e morti, alcuni erano deceduti all'interno degli abbeveratoi. In prossimità dell'allevamento era presente una fossa di stoccaggio delle deiezioni, ritenuto il sito di moltiplicazione delle mosche.

Gli accertamenti di laboratorio per la ricerca di tossina botulinica dall'acqua hanno dato tutti esito negativo. Clostridi produttori di BoNT tipo D/C sono stati invece evidenziati nel pool di ditteri prelevato al di fuori delle stanze e nelle vaschette d'abbeverata, ma solo in quelle dove erano presenti degli esemplari di dittero deceduti e dove le quaglie manifestavano sintomatologia o erano già tutte morte.

Al contrario l'acqua degli abbeveratoi in cui non erano presenti mosche morte era risultata negativa, così come il campione di alimento analizzato.

DISCUSSIONE

Quella aviare è la forma di botulismo più frequente in natura ed è dovuta principalmente al sierotipo mosaico C/D. Nel caso oggetto del presente studio, responsabile dell'episodio di malattia era un sierotipo rinvenuto sporadicamente negli uccelli, che invece

è il più frequente nei casi di botulismo bovino (Fillo et al., 2021). Questo riscontro è molto importante e apre interrogativi interessanti circa l'origine della malattia.

La mortalità a “macchia di leopardo” nelle gabbie della stessa batteria o di batterie diverse nella stessa stanza, porterebbero ad escludere la forma tossinfettiva alimentare, tipica del botulismo umano e di quello bovino. Infatti i risultati sia sull'acqua prelevata prima della distribuzione negli abbeveratoi che sull'alimento hanno dato esito negativo. La positività riscontrata negli abbeveratoi, dove le mosche andavano a morire, e negli esemplari di dittero raccolti all'esterno e all'interno dell'allevamento, fanno ritenere che questi insetti abbiano giocato un ruolo epidemiologico importante nella distribuzione anomala della mortalità osservata in allevamento.

E' da anni noto il ruolo delle larve di dittero che si sviluppano in carcasse di uccelli deceduti per botulismo nel mantenimento della malattia. Queste veicolano infatti sia le spore botuliniche che le neurotossine preformate (Duncan & Jensen, 1976; Foreyt & Abinanti, 1980; Hubalek & Halouzka, 1991; Wobeser, 1997).

Come osservato da Anza et al. (2014) anche i ditteri adulti possono avere un ruolo importante nella diffusione delle spore botuliniche, come probabilmente accaduto nel caso descritto in questa tesi. Si può ipotizzare che le mosche, portatrici di BoNT o di Clostridi BoNT-produttori, stordite dal trattamento insetticida si siano prima disperse tra le gabbie per poi morire nell'acqua degli abbeveratoi. Questo meccanismo spiegherebbe la mortalità a macchia di leopardo delle gabbie. Un effetto tossico da TMX è da escludersi in quanto si tratta di un neonicotinoide selettivo per i recettori degli insetti, mentre vengono segnalati episodi di epatotossicità cronica e carcinogenesi in mammiferi (ratti, topi, conigli).

CONCLUSIONI

La lotta alle mosche deve costituire una parte importante dei programmi di biosicurezza delle aziende avicole. Il controllo delle popolazioni di ditteri, infatti, realizzato attraverso l'applicazione di barriere anti-insetto, di trappole adesive, o di prodotti insetticidi, può rappresentare un metodo efficace di riduzione del rischio di introduzione di patogeni all'interno degli allevamenti. Queste misure non possono prescindere da una corretta gestione delle carcasse che devono prontamente essere allontanate per evitare che sulle stesse le mosche possano deporre le uova.

Nonostante sia stata evidenziata una relazione diretta tra la comparsa del botulismo negli allevamenti avicoli e la presenza delle mosche, molti sono gli aspetti che la ricerca deve ancora chiarire. Tra gli altri, ad esempio non è noto se le mosche rappresentino solo dei vettori meccanici delle spore, se fungano da vettori biologici, o se, al loro interno, il *C. botulinum* possa replicare e quindi essere diffuso, attraverso le loro escrezioni. Questo, al fine di disporre informazioni utili ad implementare piani efficaci di controllo della malattia che in alcune aree a forte vocazione avicola può avere un impatto economico significativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Anniballi, F., Auricchio, B., Woudstra, C., Fach, P., Fiore, A., Skarin, H., Bano L., Segerman, Knutsson R., & De Medici, D. (2013). Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants. *Biosecurity and bioterrorism: biodefense strategy, practice, and science*, 11(s1), S207-S214.

2. Anza, I., Vidal, D., & Mateo, R. (2014). New insight in the epidemiology of avian botulism outbreaks: necrophagous flies as vectors of *Clostridium botulinum* type C/D. *Environmental microbiology reports*, 6(6), 738-743.
3. Bano, L., Drigo, I., Tonon, E., Pascoletti, S., Puiatti, C., Annibaldi, F., Auricchio B., Lista F., Montecucco C., & Agnoletti, F. (2017). Identification and characterization of *Clostridium botulinum* group III field strains by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe*, 48, 126-134.
4. Bengtson, I. A. (1922). Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia caesar*. *Public Health Reports (1896-1970)*, 164-170.
5. Blandford, T. B., & Roberts, T. A., 1970. An outbreak of botulism in broiler chickens. *Veterinary Record*, 87, 258-261.
6. Chipault, J. G., White, C. L., Blehert, D. S., Jennings, S. K., & Strom, S. M. (2015). Avian botulism type E in waterbirds of Lake Michigan, 2010–2013. *Journal of Great Lakes Research*, 41(2), 659-664.
7. Circella, E., Camarda, A., Bano, L., Marzano, G., Lombardi, R., D’Onghia, F., & Greco, G. (2019). Botulism in Wild Birds and Changes in Environmental Habitat: A Relationship to be Considered. *Animals*, 9(12), 1034.
8. CNRB 30.012, 2021. https://www.iss.it/documents/20126/0/Metodo_CNRB30.012+%281%29.pdf/127e1605-828f-6ac6-3327-4882007099d3?t=1615198001209
9. CNRB 30.012. https://www.iss.it/documents/20126/0/Metodo_CNRB30.012+%281%29.pdf/127e1605-828f-6ac6-3327-4882007099d3?t=1615194401209.
10. Dohms, J. E., Allen, P. H., & Rosenberger, J. K. (1982). Cases of type C botulism in broiler chickens. *Avian diseases*, 204-210.
11. Duncan, R. M., & Jensen, W. I. (1976). A relationship between avian carcasses and living invertebrates in the epizootiology of avian botulism. *Journal of Wildlife Diseases*, 12(1), 116-126.
12. EU reg. 2009/1099 https://presidenza.governo.it/USRI/ufficio_studi/normativa/1099%20del%202009.pdf.
13. Fillo, S., Giordani, F., Tonon, E., Drigo, I., Anselmo, A., Fortunato, A., Lista F., & Bano, L. (2021). Extensive Genome Exploration of *Clostridium botulinum* Group III Field Strains. *Microorganisms*, 9 (11), 2347.
14. Foreyt, W. J. & Abinanti, F. R. (1980). Maggot-associated type C botulism in game farm pheasants. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177(9), 827-828.
15. Franciosa, G., Fenicia, L., Caldiani, C., & Aureli, P. (1996). PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(4), 882-885.
16. Hannett, G. E., Stone, W. B., Davis, S. W., & Wroblewski, D. (2011). Biodiversity of *Clostridium botulinum* type E associated with a large outbreak of botulism in wildlife from Lake Erie and Lake Ontario. *Applied and environmental microbiology*, 77(3), 1061-1068.
17. Hubalek, Z., & Halouzka, J. (1991). Persistence of *Clostridium botulinum* type C toxin in blow fly (*Calliphoridae*) larvae as a possible cause of avian botulism in spring. *Journal of wildlife diseases*, 27(1), 81-85.

18. Jensen, W. I., & Price, J. I. (1987). The global importance of type C botulism in wild birds.
19. Miyazaki, S., & Sakaguchi, G. (1978). Experimental botulism in chickens: the cecum as the site of production and absorption of botulinum toxin. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 31(1), 1-15.
20. Montecucco, C., G. Schiavo, & Tugnoli V. (1996). Botulism neurotoxins: mechanisms of action and therapeutic applications. *Mol Med Today*. 2:418–424.
21. Oguma, K. E. I. J. I., Yamaguchi, T. O. M. O., Sudou, K. E. I. K. O., Yokosawa, N. O. R. I. K. O., & Fujikawa, Y. O. K. O. (1986). Biochemical classification of *Clostridium botulinum* type C and D strains and their nontoxigenic derivatives. *Applied and environmental microbiology*, 51(2), 256-260.
22. Peck, M. W., Smith T. J., Anniballi F., Austin J. W., Bano L., Bradshaw M., Cuervo P., Cheng L. W., Derman Y., Dorner B. G., Fisher A., Hill K. K., Kalb S. R., Korkeala H., Lindström M., Lista F., Lúquez C., Mazuet C., Pirazzini M., Popoff M. R., Rossetto O., Rummel A., Sesardic D., Singh B. R. & Stringer S. C. (2017.) Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins* 9, 38
23. Segner, W. P., Schmidt, C. F., & Boltz, J. K. (1971). Enrichment, isolation, and cultural characteristics of marine strains of *Clostridium botulinum* type C. *Applied microbiology*, 22(6), 1017-1024.
24. Skarin, H., Hafstrom, T., Westerberg, J., & Segerman, B. (2011). *Clostridium botulinum* group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements. *BMC Genomics*, 12, 185-2164-12-185. doi:10.1186/1471-2164-12-185 [doi]
25. Souillard, R., Grosjean, D., Le Gratiet, T., Poëzevara, T., Rouxel, S., Balaine, L., Macé S., Martin L., Anniballi F., Chemaly M., Le Bouquin S., & Le Maréchal, C. (2021). Asymptomatic carriage of *C. botulinum* type D/C in broiler flocks as the source of contamination of a massive botulism outbreak on a dairy cattle farm. *Frontiers in microbiology*, 12, 679377.
26. Souillard, R., Le Marechal, C., Ballan, V., Rouxel, S., Leon, D., Balaine, L., Poëzevara T., Houard E., Robineau B., Robinault C., Chemaly M., & Le Bouquin, S. (2017). Investigation of a type C/D botulism outbreak in free-range laying hens in France. *Avian Pathology*, 46(2), 195-201.
27. Takeda, M., Tsukamoto, K., Kohda, T., Matsui, M., Mukamoto, M., & Kozaki, S. (2005). Characterization of the neurotoxin produced by isolates associated with avian botulism. *Avian diseases*, 49(3), 376-381.
28. Vidal, D., Anza, I., Taggart, M. A., Pérez-Ramírez, E., Crespo, E., Hofle, U., & Mateo, R. (2013). Environmental factors influencing the prevalence of a *Clostridium botulinum* type C/D mosaic strain in nonpermanent Mediterranean wetlands. *Applied and environmental microbiology*, 79(14), 4264-4271.
29. Wobeser, G. A. (1997). *Diseases of wild waterfowl*. Springer Science & Business Media.
30. Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene M., Bâyon-Auboyer M.H., Buffereau J.P., De Medici, D., Fach P. (2012). Neurotoxin gene profiling of *clostridium botulinum* types C and D native to different countries within europe. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3120-3127.

RESISTENZA DI *DERMANYSSUS GALLINAE* A PHOXIM E PIRETROIDI: LA SITUAZIONE STA CAMBIANDO?

Schiavone A.¹, Pugliese N.¹, Siddique I.¹, Samarelli R.¹ Saleh M.^{1,2}, Circella E.¹, Romito D.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), Italia

² Department of Animal Production, Faculty of Agriculture at Moshtohor, Benha University, Qalyubia, Egypt

Summary

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1978), the poultry red mite (PRM), is a major threat in the poultry industry worldwide, due to its heavy impact on both animal health and production, the related economic losses, and its vectorial role in some infectious diseases. The control of the PRM is particularly challenging because of several factors, such as the upsurge of mite populations resistant to acaricides worldwide. An eight-year survey (2018-2015) on the susceptibility of Italian PRM populations to phoxim, amitraz, and l-cyhalothrin reported a decreasing trend in the efficacy of those drugs during the years. With this in mind, the study was aimed to investigate the evolution of the efficacy of some of those acaricides after eight years. Eleven PRM populations from Apulia and Campania were tested *in vitro* for their susceptibility to a 2X concentration of phoxim and cypermethrin with respect to those indicated by the manufacturer. The percent efficacy of the drugs was extremely variable, with overall mean values of 75.97% for phoxim and 49.05% for cypermethrin. Compared to the results from the previous survey, the trend of acaricide efficacy showed wide fluctuations during the years, mostly for phoxim, whose efficacy increased from 65% in 2015 to 75.97%. The obtained results confirm that acaricide resistance is still a concrete issue in the poultry industry, thus highlighting the pivotal role of a tailored strategy in the fight against *D. gallinae*.

INTRODUZIONE

Dermanyssus gallinae (De Geer, 1978) è un acaro ematofago notturno particolarmente temuto nel settore avicolo intensivo, con una prevalenza che si assesta anche intorno al 90% in alcuni Paesi europei [1]. Questo acaro esercita un notevole impatto negli allevamenti infestati, che si manifesta direttamente sugli animali in termini di calo della deposizione, irritabilità, cannibalismo ed anemia, fino addirittura alla morte, in caso di infestazioni massive [1]. Non meno preoccupante è il ruolo che *D. gallinae* può assumere nel favorire la diffusione e la trasmissione di alcuni importanti agenti patogeni del pollame, tra cui *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis e Gallinarum, ed il virus dell’Influenza aviare [2]. Gli effetti nocivi della presenza dell’acaro rosso si ripercuotono anche da un punto di vista economico, con perdite annuali stimate intorno ai 130 milioni di euro negli allevamenti europei, sia per le conseguenti perdite produttive, che per i trattamenti contro il parassita [3]. Il controllo delle infestazioni da *D. gallinae* risulta particolarmente difficile da attuare a causa di diversi fattori. Il ciclo biologico dell’acaro rosso, dalle uova allo stadio

di adulto, può completarsi anche in soli 7 giorni in condizioni ambientali favorevoli, rendendo così possibile il raddoppiamento della popolazione all'interno del capannone in una sola settimana [1]. In breve tempo, la densità della popolazione può raggiungere i 50.000 acari per ciascun animale, arrivando addirittura a 500.000 in caso di infestazioni massive [1]. Inoltre, *D. gallinae* può essere presente in modo permanente all'interno dei capannoni infestati, anche in assenza di animali durante il vuoto sanitario, riuscendo a sopravvivere persino 8 mesi senza compiere alcun pasto di sangue [4]. Oltre alle difficoltà legate alle proprietà biologiche dell'acaro, il controllo delle infestazioni è reso ancora più complicato dall'insorgenza di fenomeni di resistenza nei confronti delle sostanze più comunemente utilizzate. Gli acaricidi sintetici e semisintetici sono tuttora la scelta più adottata, sebbene numerose soluzioni alternative siano state proposte a partire dagli ultimi anni [5]. In passato il controllo di *D. gallinae* si basava su composti perlopiù utilizzati in campo agricolo, come piretrine, piretroidi e carbammati, non autorizzati per l'utilizzo negli allevamenti avicoli, con la limitazione di non poter essere impiegati in presenza di animali [6]. Solo negli ultimi anni sono stati immessi sul commercio prodotti specifici per la lotta all'acaro rosso, quali phoxim, spinosad e, più recentemente, fluralaner, che rappresentano al momento la scelta d'elezione. Nel corso degli anni numerose segnalazioni di popolazioni di *D. gallinae* resistenti ad una o più di queste sostanze sono state riportate in molti Paesi, compresa l'Italia [5, 7]. In particolare, uno studio condotto su allevamenti di galline ovaiole italiani in un arco di tempo di 8 anni ha evidenziato come le percentuali di efficacia di l-cialotrina, phoxim e amitraz tendano a diminuire drasticamente nel corso del tempo [5]. Alla luce di tali considerazioni, questo studio si propone di portare avanti le ricerche precedenti, in modo da approfondire l'andamento della sensibilità agli acaricidi nell'acaro rosso in Italia, valutando se e come la situazione sia cambiata a distanza di 8 anni.

MATERIALI E METODI

Test di sensibilità

I campioni di *D. gallinae* sono stati prelevati da 11 allevamenti industriali di galline ovaiole in Puglia e Campania. Una volta raccolti, sono stati sottoposti ad un periodo di *starvation* per 5 giorni al buio e a temperatura ambiente.

È stata testata *in vitro* la sensibilità dei campioni di acari nei confronti di phoxim (Bye-Mite, Bayer Animal Health, Leverkusen, Germany) e cipermetrina (Bio Revanol, Sandokan, Italia). Gli acaricidi sono stati testati ad una concentrazione 2 volte superiore a quella consigliata dal produttore per l'uso in campo (2X).

Il test di efficacia è stato allestito tramite la tecnica per contatto descritta da Thind e Muggleton [8]. In breve, due sezioni di carta da filtro sono state impregnate con 200 mL di soluzione acaricida. Successivamente 20 acari sono stati posizionati sulla carta da filtro con un pennello. Le due sezioni sono state quindi sigillate tramite un sottile strato di colla vinilica lungo il margine esterno, realizzando così delle celle che sono state incubate per 24 h a 20°C. Al termine del periodo di incubazione, ciascuna cella è stata aperta e gli acari all'interno sono stati esaminati, registrando il numero di acari vivi e morti con l'aiuto di uno stereomicroscopio. Per ogni prova è stato eseguito un controllo negativo, utilizzando acqua al posto della soluzione acaricida. Per ciascuna popolazione di acari le prove sono state effettuate in triplicato.

La percentuale di efficacia è stata calcolata applicando la formula di Abbott [9], modificata tenendo conto della media dei tre replicati.

$$\% \text{ di efficacia} = \frac{(\text{media acari di controllo vivi} - \text{media acari trattati vivi})}{\text{media acari di controllo vivi} \times 100}$$

Sulla base della sensibilità agli acaricidi testati, le popolazioni di *D. gallinae* sono state classificate in quattro classi di efficacia (EC). Le popolazioni con una EC compresa tra 0-20% sono state considerate altamente resistenti (AR), tra 21-40% moderatamente resistenti (MR), tra 41-60% intermedie (I), tra 61-80% sensibili (S) e tra 81-100% altamente sensibili (AS).

Analisi statistica

La distribuzione normale delle percentuali di efficacia di phoxim e cipermetrina per le popolazioni di *D. gallinae* analizzate è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk. La normalità è stata considerata nulla per entrambi i gruppi ($p < 0.05$). Pertanto, sono stati calcolati il valore centrale e l'intervallo di confidenza al 90% (IC90) tramite lo stimatore del valore centrale di Hodges-Lehmann. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante il software R v.4.1.2 [10] ed il package DescTools v.0.99.44.

RISULTATI

La percentuale di efficacia per phoxim e cipermetrina ha mostrato ampie fluttuazioni all'interno delle diverse popolazioni di acari analizzate (Tabella 1). In particolare, l'efficacia del phoxim varia dal 9,5 al 100%, con un valore medio del 75,97% (IC90 = 48,6-85,55). Per la cipermetrina invece l'efficacia spazia dal 27,7 al 100%, con un valore medio del 49,05% (IC90 = 34,99-67,5).

Tabella 1. Percentuale di efficacia di phoxim e cipermetrina sulle popolazioni di *D. gallinae* testate.

Popolazione	Phoxim		Cipermetrina	
	% di efficacia	Classe di efficacia	% di efficacia	Classe di efficacia
Bari	71,10	S	98,48	AS
Napoli	81,70	AS	60,00	I
Caserta	9,50	AR	27,70	MR
Lecce	77,80	S	40,70	I
Lecce	100,00	AS	70,00	S
Lecce	87,70	AS	38,60	MR
Lecce	91,70	AS	35,00	MR
Lecce	86,40	AS	35,00	MR
Bari	16,70	AR	28,30	MR
Taranto	71,00	S	100,00	AS
Lecce	63,50	S	38,90	MR
Mediana	75,97		49,05	

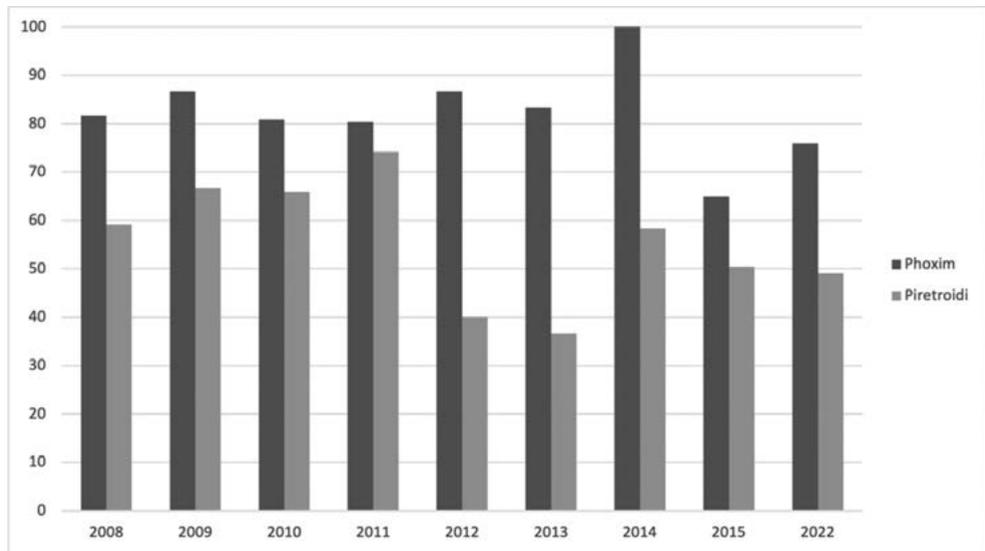
I valori ottenuti mediante i test di efficacia, analizzati in funzione dell'EC per phoxim e cipermetrina, sono elencati in Tabella 2.

Tabella 2. Distribuzione delle popolazioni di *D. gallinae* in funzione della classe di efficacia di phoxim e cipermetrina.

Classe di efficacia	Phoxim	Cipermetrina
Altamente sensibile	5/11 (45,4%)	2/11 (18,2%)
Sensibile	4/11 (36,4%)	1/11 (9,1%)
Intermedia	0/11 (0%)	2/11 (18,2%)
Moderatamente resistente	0/11 (0%)	6/11 (54,5%)
Altamente resistente	2/11 (18,2%)	0/11 (0%)

I dati ottenuti sono stati confrontati con quelli relativi al periodo di tempo compreso fra il 2008 e il 2015, riportati da Pugliese *et al.* [5] (Figura 1).

Figura 1. Andamento della percentuale di efficacia media del phoxim e dei piretroidi nei confronti di *D. gallinae* dal 2008 al 2022, sulla base della concentrazione 2X.



DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in questo studio hanno confermato, come già precedentemente evidenziato, che il fenomeno della resistenza agli acaricidi è un problema ancora molto presente in campo avicolo. Infatti, la percentuale di efficacia di due tra le sostanze più utilizzate per la lotta contro l'acaro rosso è risultata pari a 75,97% per il phoxim e 49,05% per la cipermetrina. Ciò che emerge maggiormente è soprattutto l'ampia fluttuazione dei valori di efficacia all'interno delle diverse popolazioni

analizzate. Per il phoxim la maggior parte delle popolazioni testate è risultata altamente sensibile (45,4%) o sensibile (36,4%), sebbene il 18,2% si sia dimostrato altamente resistente, con l'assenza di popolazioni intermedie o moderatamente resistenti. Al contrario, per la cipermetrina oltre la metà delle popolazioni testate è risultata moderatamente resistente (54,5%), mentre solo il 18,2% e il 9,1% ricadeva fra gli altamente sensibili e sensibili, rispettivamente.

Confrontando i dati ottenuti in questo studio con quelli relativi al periodo 2008-2015 [5], appare evidente che l'andamento dell'efficacia di phoxim e piretroidi non sia costante nel tempo, ma tenda piuttosto a manifestare ampie fluttuazioni. I piretroidi mostrano in generale una minore efficacia rispetto al phoxim, aspetto che si evidenzia nell'intero arco di tempo esaminato. Inoltre, sono soggetti a maggiori fluttuazioni nell'andamento della loro efficacia, sebbene la situazione sia rimasta piuttosto simile dal 2015 al 2022. Al contrario, l'efficacia del phoxim si è mantenuta piuttosto elevata e costante negli anni, fino al 2015, quando ha subito un notevole calo, con la comparsa delle prime popolazioni di acari resistenti. A distanza di 8 anni appare evidente come l'efficacia del phoxim sia nuovamente risalita, passando dal valore medio del 65% del 2015 al 75,97% del 2022.

Una possibile spiegazione per il trend dell'efficacia del phoxim è legata al fatto che fino a pochi anni fa era tra le uniche sostanze autorizzate per l'utilizzo in presenza di animali, insieme allo spinosad. In tal senso, dopo i primi anni di elevata efficacia, il suo impiego costante e talvolta quasi esclusivo potrebbe aver favorito l'insorgenza di resistenze. La recente introduzione del fluralaner ha diversificato la scelta dei prodotti da poter utilizzare, andando probabilmente a variare la sensibilità delle popolazioni di acari nei confronti delle altre sostanze presenti sul mercato. In questo modo, potrebbe anche aver determinato nel corso degli ultimi anni la risalita dell'efficacia di altri acaricidi con diverso meccanismo d'azione, come il phoxim.

Come già ampiamente constatato, infatti, l'efficacia degli acaricidi può essere compromessa dal loro uso eccessivo o improprio nel corso degli anni, soprattutto in termini di frequenza di applicazioni e concentrazioni utilizzate [6]. Tali condizioni possono facilmente favorire la comparsa di popolazioni di acari resistenti, grazie ad un meccanismo di pressione selettiva. Infatti, ad ogni trattamento la popolazione sensibile di partenza viene impoverita e progressivamente rimpiazzata da una sub-popolazione resistente, che possiede un carattere fenotipico più vantaggioso per la sopravvivenza della popolazione stessa. Questo fenomeno potrebbe giustificare l'elevata variabilità della sensibilità delle diverse popolazioni di *D. gallinae* analizzate. Infatti, i protocolli per il controllo dell'acaro rosso adottati in allevamento sono tutt'altro che standardizzati, variando soprattutto in funzione della scelta della sostanza da applicare e della frequenza dei trattamenti. In questo modo le popolazioni di acari vanno naturalmente incontro ad una diversificazione dei caratteri alla base della sensibilità alle sostanze acaricide, determinando la variabilità della risposta ai trattamenti.

Pertanto, alla luce di queste considerazioni, l'obiettivo principale nel controllo all'acaro rosso dovrebbe tener conto di tali considerazioni, cercando di evitare la selezione delle sub-popolazioni resistenti tramite la rotazione delle sostanze a disposizione e l'uso oculato degli acaricidi, in funzione della loro efficacia.

CONCLUSIONE

Alla luce dei risultati ottenuti in questo studio, appare evidente che il problema della resistenza di *D. gallinae* nei confronti di alcune delle sostanze più utilizzate, come phoxim e piretroidi, assuma ancora un ruolo rilevante. Sulla base di queste considerazioni e dei dati emersi da questo studio, appare chiaro che la strategia migliore per la lotta farmacologica all'acaro rosso non possa escludere dei programmi di rotazione delle sostanze a disposizione, così come la scelta di prodotti la cui efficacia sia prima verificata tramite prove di laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Sparagano OAE, George DR, Harrington DWJ and A Giangaspero. (2014). Significance and control of the Poultry Red Mite *Dermanyssus gallinae*. *Annu. Rev. Entomol.* 59: 447-466.
2. Schiavone A, Pugliese N, Otranto D, Samarelli R, Circella E, De Virgilio C and A Camarda. (2022). *Dermanyssus gallinae*: the long journey of the poultry red mite to become a vector. *Parasit. Vectors*, 15: 29.
3. R Van Emous. (2005). Wage war against the red mite! *Poult. Int.*, 44: 26-33.
4. C Chauve. (1998). The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): current situation and future prospects for control. *Ve. Parasitol.* 79: 239-245.
5. Pugliese N, Circella E, Cocciolo G, Giangaspero A, Tomic DH, Kika TS, Caroli A and A Camarda. (2019). Efficacy of l-cyhalothrin, amitraz, and phoxim against the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* De Geer, 1778 (Mesostigmata: Dermanyssidae): an eight-year survey. *Avian Pathol.* 48: 35-43.
6. Marangi M, Morelli V, Pati S, Camarda A, Cafiero MA and A Giangaspero. (2012). Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. *PLoS ONE*, 7: e31795.
7. Katsavou E, Vlogiannitis S, Karp-Tatham E, Blake DP, Ilias A, Strube C, Kikoulos I, Dermauw W, Van Leeuwen T and J Vontas. (2019). Identification and geographical distribution of pyrethroid resistance mutations in the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Pest Manag. Sci.* 76: 125-133.
8. Thind BB and J Muggleton. (1998). A new bioassay method for the detection of resistance to pesticides in the stored product mite *Acarus siro* (Acari: Acaridae). *Exp. Appl. Acarol.* 22: 543-552.
9. WS Abbott. (1987). A method of computing the effectiveness of an insecticide. 1925 *J. Am. Mosq Control Assoc.* 18: 265-267.
10. R Core Team. (2018). R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>.