

## TOSSINFEZIONE DA BOTULISMO IN POLLI COMMERCIALI

Massi P., Tosi G., Fiorentini L., Taddei R.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna- Sezione di Forlì.*

### Riassunto

Si descrive un episodio di tossinfezione da *Clostridium botulinum* tipo C che ha interessato un allevamento di broiler di 42 giorni di età nell'estate 2009. I fattori che hanno caratterizzato l'evento come l'insorgenza in una specie animale non comune a fenomeni di botulismo, la velocità di diffusione nei diversi capannoni che compongono l'allevamento, l'elevata percentuale di mortalità ci portano a dover considerare l'importanza degli effetti dell'intossicazione botulinica anche nell'allevamento intensivo italiano del pollo da carne.

### Abstract

During the summer of 2009, a flock of commercial broiler chickens experienced unusually high death losses at 42 days of age. Six broilers were submitted to the IZSLER laboratory for assistance. The elevated mortality was associated with incoordination, flaccid paralysis of leg, wing and neck muscles. Type C botulinum was identified in hearth and ceca by mouse bioassay tests and PCR test.

### Introduzione

Il botulismo è una sindrome neurologica caratterizzata da paralisi flaccida della muscolatura. Il botulismo colpisce l'uomo e numerose specie animali ed è causato dall'azione di una neurotossina prodotta da un batterio anaerobio e sporigeno, *Clostridium botulinum*. Esistono sette tipi di tossina botulinica (identificati con le lettere da A a G); i tipi C e D sono maggiormente coinvolti nel botulismo animale. Non tutti i ceppi di *Clostridium botulinum* sono tossinogeni, infatti dal punto di vista diagnostico l'isolamento del batterio non è sufficiente a confermare la malattia, ma è necessario dimostrare la presenza della tossina. L'abitat principale di *Clostridium botulinum* è l'ambiente. La resistenza delle spore a numerosi agenti chimici e fisici consente al batterio di sopravvivere per lunghissimi periodi di tempo.

In condizioni favorevoli le spore germinano producendo la forma vegetativa del batterio che si moltiplica e produce la tossina. I ceppi di *Clostridium botulinum* non hanno la medesima ripartizione geografica: per esempio i ceppi C e D hanno una temperatura ottimale di crescita compresa fra i 30 e i 40°C e sono particolarmente esigenti di materia organica, per questa ragione si ritrovano soprattutto in zone ricche di sostanza organica di paesi caldi e di regioni temperate durante i mesi estivi.

Nel settore avicolo il botulismo è una patologia nota da molto tempo nelle anatre e nelle specie acquatiche. Casi di botulismo non sono rari anche nel fagiano. La presenza di acque stagnanti ricche di materia organica favorisce la moltiplicazione dei clostridi e la produzione della tossina. Le carcasse degli animali deceduti costituiscono una ricca fonte di tossina botulinica favorendo così la diffusione della malattia. In tal senso è importante il ruolo degli insetti (larve e adulti) e di vermi terricoli che assumono la tossina e vengono successivamente ingeriti dai volatili.

Nel pollame industriale la segnalazione di casi di botulismo è sempre stata piuttosto sporadica. Tuttavia, in questi ultimi anni, sono aumentate le segnalazioni in gruppi industriali di polli da carne in diversi paesi europei. I focolai finora diagnosticati sono riconducibili ai tipi C e D, anche se non mancano segnalazioni relative al tipo E. Come fonte d'origine della contaminazione in alcuni casi si ipotizza l'impiego di acqua proveniente da laghi artificiali naturalmente contaminati (Carlier J.P. et al.). Una volta avviata, l'intossicazione si diffonde rapidamente attraverso l'ingestione delle carcasse degli animali deceduti e di adulti e larve di mosche e coleotteri. Dal punto di vista clinico il botulismo aviario è caratterizzato da un breve periodo di incubazione: da poche ore a 1-2 giorni in funzione della dose di tossina ingerita. Gli animali colpiti presentano una tipica paralisi flaccida che procede dalle zampe fino a raggiungere ali, collo e palpebre. La morte sopraggiunge per deficit cardiaco e respiratorio e per l'impossibilità di muoversi. In alcuni casi si osservano fenomeni diarroici e la presenza di eccessi di urati nelle deiezioni. Gli indici di morbilità e mortalità variano e possono raggiungere livelli molto elevati. Gli animali morti non presentano lesioni macroscopiche e microscopiche (Trampell et al. 2005).

### **Descrizione del caso clinico**

Durante il mese di agosto 2009, un allevamento di circa 1 milione di polli da carne commerciali Ross 708 di 44 giorni di età presentava un mortalità elevata ed improvvisa.

I polli avevano avuto il seguente schema vaccinale: a 1 giorno di vita per Malattia di Gumboro, Bronchite Infettiva aviaria, Malattia di Newcastle e per Coccidiosi. In allevamento i polli erano stati sottoposti ad un richiamo vaccinale per Bronchite Infettiva aviaria e Malattia di Newcastle.

I soggetti erano alimentati con mangime composto prodotto nel mangimificio aziendale e sostituito con cadenze ravvicinate visto l'elevato numero di soggetti allevati. L'acqua di bevanda dal primo giorno era fornita da laghi artificiali circostanti l'azienda.

A 22 giorni di vita i polli venivano sottoposti a terapia antibiotica con amoxicillina per problemi enterici. A 28 giorni di vita appena terminata la terapia è iniziata la mortalità in alcuni reparti dell'azienda. La mortalità e la forma enterica facevano sospettare una forma di Malattia di Gumboro dal momento che la stessa azienda ne era stata colpita nel ciclo di allevamento precedente, ma gli esami di laboratorio eseguiti sulle borse di Fabrizio non portavano alla conferma diagnostica.

Nel frattempo la situazione clinica e la mortalità peggioravano tanto che a 44 giorni la patologia interessava quasi esclusivamente i soggetti maschi e la mortalità andava dall'1-2% al giorno di certi reparti al 10% al giorno in altri reparti. Neppure la pratica del diradamento delle femmine ed una successiva terapia con tylosina portava ad un miglioramento della situazione. La sintomatologia clinica era rappresentata da animali molto prostrati con il becco appoggiato a terra, anoressia e rigurgito di saliva che fuoriusciva dal becco tenuto penzoloni. Colpiti anche soggetti sviluppati e cresciuti molto bene. In poche ore i soggetti passavano dalla fase di prostrazione ad una sorta di paralisi flaccida degli arti inferiori, delle ali e del collo fino alla morte.

Sulla base del sospetto clinico di botulismo i soggetti venivano trattati con penicillina (20 mg/Kg per 5 giorni).

## **Esame autoptico**

I soggetti pervenuti vivi all'IZSLER-Sezione di Forlì all'età di 44 giorni presentavano un'incoordinazione dei movimenti, paralisi flaccida degli arti, delle ali e dei muscoli del collo, una postura del corpo caratterizzata da abbassamento ed incurvamento del collo con presenza di diarrea. I dati anamnestici e l'aspetto clinico conducevano fortemente al sospetto di botulismo, anche se il botulismo in Italia negli ultimi anni non è mai stato segnalato nell'allevamento intensivo del broiler e quindi rappresenta un evento raro.

A livello anatomopatologico si evidenziava solo una enterite catarrale .

Si prelevavano il cuore, il fegato e l'apparato gastroenterico ai fini dell'isolamento della forma vegetativa del batterio e della messa in evidenza della tossina botulinica tramite prova biologica su topolino.

Dopo 5 giorni al laboratorio pervenivano due campioni di acqua, uno prelevato direttamente dal lago ed uno prelevato in allevamento dall'impianto di raffreddamento e un campione costituito da un pool di coleotteri ambientali per la ricerca del *Clostridium botulinum*.o della tossina.

I campioni venivano processati direttamente su coltura e per inoculazione su topini.

## **Esami di laboratorio**

Gli organi venivano messi in coltura per l'isolamento del Clostridio secondo la tecnica descritta dal metodo di prova interno MP23/05 Rev.2.

L'omogenato d'organi era suddiviso in due aliquote, una di queste veniva trattata termicamente a 80°C per 10 minuti (Cook et al., 1998).

Con ognuno dei due omogenati d'organo venivano inoculati due topolini per via sottocutanea e due topolini per via endoperitoneale.

I campioni di acqua e i coleotteri venivano processati in modo analogo ai visceri animali.

I ceppi di Clostridi isolati venivano identificati biochimicamente (Lindstrom et.al., 2006), reinoculati nei topolini (Cook et al.,1998) e sottoposti alla tecnica di PCR per l'identificazione del tipo di tossina (Franciosa et al., 1996; Szabo et al., 1993).

## **Risultati**

Il batterio veniva isolato direttamente dal cuore e intestino degli animali esaminati, dall'acqua di allevamento e dal pool di coleotteri e identificato come *Clostridium botulinum*.

La prova biologica risultava positiva dall'omogenato d'organi, dal campione d'acqua prelevata in allevamento e dal pool di coleotteri.

In particolare, dopo 24 e 36 ore morivano i topolini inoculati per le diverse vie con l'aliquota trattata termicamente da omogenato d'organo degli animali morti a dimostrazione della presenza della tossina botulinica.

Dopo 36 ore venivano a morte i due topolini inoculati per via endoperitoneale con l'aliquota trattata termicamente da omogenato di pool di coleotteri.

Anche l'acqua di allevamento trattata termicamente e inoculata nei topolini li portava a morte in 24-36 ore per via endoperitoneale.

La coltura di *C.botulinum* ottenuta, inoculata nei topolini li portava a morte dopo 24 ore con reisolamento dello stesso dal fegato.

Le PCR eseguite sui Clostridi isolati dagli animali e dall'acqua di allevamento sono risultate positive per *Clostridium botulinum* tipo C (Franciosa et al., 1996).

### **Considerazioni**

Il caso clinico descritto presenta delle caratteristiche uniche per la realtà avicola italiana del pollo da carne sia per l'elevata perdita di animali che per le possibili implicazioni sulla salute umana che comunque si sono dimostrate prive di importanza in seguito alla tipizzazione del tipo di tossina.

In diversi Paesi Europei (Francia, Inghilterra, Germania e Svezia) negli ultimi anni ci sono state diverse segnalazioni di casi di botulismo nel broiler, nel tacchino e nella gallina. L'episodio qui descritto si inserisce nella casistica europea, inoltre le indagini eseguite ci hanno portato ad identificare nell'acqua di bevanda il primo "movens" per l'introduzione del botulino in azienda. La stagione molto calda, le acque stagnanti da giorni e l'improvvisa pioggia dei giorni precedenti le prime mortalità che potrebbe aver riportato in superficie il batterio e/o le tossine in concentrazione tale da infettare per ingestione con l'acqua di bevanda i soggetti in esame, sono le cause favorevoli dell'insorgenza della tossinfezione. In seguito l'elevata concentrazione dei coleotteri ambientali anch'essi infettati può aver amplificato il problema quando ingeriti dai polli. Anche il fenomeno del cannibalismo dei polli morti contribuiva alla diffusione della tossinfezione con ingestione di tossine preformate.

### **Conclusioni**

La mortalità in azienda, dopo l'utilizzo della penicillina, la rimozione immediata dei soggetti che venivano a morte, la sostituzione dell'acqua di bevanda dei lagoni con acqua dell'acquedotto, ha portato ad una netta riduzione della mortalità giornaliera dal 5-10% all'0,1% circa nei capannoni maggiormente colpiti. Gli animali dei capannoni non colpiti venivano prontamente mandati alla macellazione, mentre negli capannoni colpiti si aspettava la riduzione totale della mortalità e la tipizzazione del tipo di tossina per l'invio al macello.

### **Bibliografia**

1. Carlier J.P. et al. 2002. Bulletin Acad. Vet. de France, vol. 155 p.295-302.
2. Cook L.V., Lee W.H., Lattuada C.P., Ransom G.M. 1998. Methods for the detection of *Clostridium botulinum* toxins in meat and poultry products. USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook 3<sup>rd</sup> Edition/1998.
3. Franciosa G, Fenicia L, Caldiani C, Aureli P. 1996. PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples. J Clin Microbiol. Apr;34(4):882-5
4. Lindstrom M., Korkeala H. 2006. Laboratory Diagnostics of botulism. Clinical Microbiology Review, April, p.298-314.
5. Szabo EA, Pemberton JM, Desmarchelier PM. 1993. Detection of the genes encoding botulinum neurotoxin types A to E by the polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol. Sep;59(9):3011-20.
6. Trampel D.W., Smith S.R., Rocke T.E. 2005. Toxicoinfectious Botulism in commercial caponized chickens. Avian Diseases, Vol.49,n.2,p.301-303.