

BOTULISMO INDOTTO DA TOSSINA MOSAICO C/D IN UN'AREA NATURALE PROTETTA

Circella E.¹, Bano L.², Greco G.¹, Marino M.¹, Cocciolo G.¹, D'Onghia F.¹, Marzano G.³, 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, Bari, Italia*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Treviso, Italia;*

³*Riserva naturale "Torre Guaceto", Carovigno BR, Italia*

Summary

Botulism is a paralytic disease caused by botulinum neurotoxins (BoNTs). BoNTs type C and D are responsible for the most cases of avian botulism. This is the first report concerning a large avian botulism outbreak due to the exposure to BoNTs type C/D, occurred in a wildlife sanctuary in Southern Italy.

INTRODUZIONE

Il botulismo è una grave patologia caratterizzata da paralisi flaccida causata dall'assunzione di neurossine botuliniche (BoNTs) prodotte da germi anaerobi, sporigeni, Gram-positivi appartenenti al genere *Clostridium*. BoNTs sono classificate in 7 diversi sierotipi, A, B, C, D, E, F. Tra questi, i tipi C e D sono riconosciuti come più frequenti responsabili della maggior parte dei casi di botulismo aviario.

Nei volatili selvatici la patologia è stata descritta fin dal 1920 negli Stati Uniti, laddove è ancora molto presente, e successivamente in Australia nel 1931 (Pullar, 1934), in Sud America nel 1947 (Szyfres et al., 1948) ed in Giappone nel 1963 in uccelli acquatici. Rispetto al panorama mondiale, in Europa le segnalazioni di botulismo nei selvatici sono relativamente recenti. Nell'avifauna selvatica vennero descritti focolai in Danimarca nel 1967, e successivamente in Inghilterra nel 1969 ed in Svezia nel 1975. Ulteriori focolai sono stati riportati in Danimarca, in Norvegia, in Olanda, in Ungheria, in Repubblica Ceca, in Serbia, in Slovenia, in Francia, in Germania, in Irlanda, nel Regno Unito ed in Spagna (Neimanis and Speck, 2012). In tutti i casi descritti, il tossinotipo responsabile è risultato il tipo C, portando a ritenere il botulismo di tipo C quello più diffuso dal punto di vista epidemiologico in Europa.

In Italia, i dati sono piuttosto scarsi e frammentari, con una segnalazione nel 2001 ed una più recente nel 2011 (De Filippo et al., 2013), e la descrizione di focolai verificatisi rispettivamente in Lombardia ed in Emilia Romagna. Anche in questi casi, la tossina responsabile della patologia è stata classificata come tossina di tipo C.

Recentemente, sono stati riportati alcuni casi di botulismo in volatili acquatici in Europa ed in Giappone, causati da una tossina mosaico delle tossine C e D (Woudstra et al., 2012).

Lo scopo di questo lavoro è quello di riportare un caso di botulismo indotto da una tossina mosaico di tipo C/D, osservato per la prima volta in Italia e caratterizzato da mortalità di volatili selvatici in una oasi naturale protetta.

MATERIALI E METODI

Breve descrizione del caso e dell'oasi naturale in cui si è verificato il focolaio

Il caso di botulismo è stato osservato a Torre Guaceto (40°42'54.69"N, 17°47'59.58"E), un'oasi naturale protetta inclusa dal 2008 tra le *Specially Protected Areas of Mediterranean Importance (SPAMI)*. L'oasi si trova a Carovigno in provincia di Brindisi e si estende su 1500 ettari, con un'area umida di dimensioni pari a 200 ettari. Nell'oasi sono presenti più di 180 differenti specie di volatili selvatici, la maggior parte delle quali rappresentate da specie di uccelli migratori. Nell'area umida, alcuni mesi prima della comparsa del focolaio, era stata allestita una vasca artificiale in cui erano stati posti dei cefali (*Mugil cephalus*) al fine di fornire una ulteriore fonte di approvvigionamento alimentare per i volatili ospitati nell'oasi.

Il numero di pesci all'interno della vasca artificiale è tuttavia, col tempo, aumentato esponenzialmente con conseguente comparsa di mortalità che ha raggiunto il picco verso fine estate, tra la fine di agosto e gli inizi del mese di settembre, quando le temperature ambientali mediamente erano pari o superiori a 30 °C. In questo stesso periodo, è stata osservata la comparsa di mortalità tra i volatili. In particolare, sono stati ritrovati deceduti: 7 germani reali (*Anas platyrhynchos*), 4 alzavole (*Anas teal*), 1 marzaiola (*Anas querquedula*), 2 piro piro boscherecci (*Tringa glareola*), 1 garzetta (*Egretta garzetta*), 1 tuffetto (*Tachybaptus ruficollis*) e 4 folaghe (*Fulica atra*). Vista la vastità dell'area naturale, non si può escludere che non vi siano stati altri soggetti deceduti che non sono stati individuati. Inoltre sono stati rinvenuti frammenti di ali e parti di carcasse di animali, molto probabilmente predati in seguito al decesso. Un germano reale ed un piro piro boschereccio sono stati ritrovati ancora vivi ma sono deceduti dopo poche ore dal ritrovamento. Prima del decesso, gli animali apparivano incapaci di volare ed in preda a paralisi flaccida del collo e delle ali, che ricadevano a peso morto se sollevate manualmente.

Due germani reali, 2 piro piro boschereccio, una garzetta ed un tuffetto sono pervenuti presso la sezione di Patologia Aviaria del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Bari per l'esecuzione di accertamenti diagnostici. Tuttavia, tali accertamenti sono stati effettuati dai due germani reali, uno dei quali era stato rinvenuto ancora vivo, ed uno dei due piro piro boscherecci, in quanto i restanti soggetti sono stati scartati per la presenza di eccessivi fenomeni di decomposizione e degradazione delle carcasse.

Indagini di laboratorio

Campioni di tessuto (fegato, intestino, cervello e coagulo ematico dalle cavità cardiache) sono stati raccolti, in sede autoptica, per gli accertamenti diagnostici. Poiché i dati anamnestici, i segni clinici osservati nei due volatili ritrovati ancora vivi, ed il quadro anatomo-patologico hanno indotto ad ipotizzare un focolaio di botulismo, le analisi sono state orientate alla ricerca di *Clostridium botulinum* e delle tossine. Inoltre, come possibili responsabili di sintomatologia nervosa nei volatili, sono stati ricercati anche gli agenti responsabili della Malattia di Newcastle e dell'Influenza aviaria.

Per la ricerca di *C. botulinum* e delle tossine botuliniche, i campioni di fegato ed intestino sono stati seminati in un brodo di arricchimento (Fortified Cooked Meat Medium - FCMM) (Kurazono et al., 1985), nel rapporto di 1:10 e sottoposti a trattamento termico a 71 °C per 10 minuti. Successivamente, i brodi sono stati incubati a 37 °C in condizioni di anaerobiosi con il 5% di idrogeno, il 5% di biossido di carbonio e il 90% di nitrogeno (Bactron IV anaerobic chamber - Shel Lab, Cornelius, OR, USA). Dopo 48 ore di incubazione, sono stati prelevati 175 µl di dal fondo di ogni brodocoltura e sottoposti ad estrazione del DNA mediante MagMax Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion/Life Technologies, Carsland, CA, USA) e PCR per la ricerca di geni di *C. botulinum* codificanti per le neurotossine A, B, C, D, E, F secondo un protocollo precedentemente descritto (De Medici et al., 2009). Le brodoculture corrispondenti ai campioni risultati positivi sono state ripassate sul terreno di coltura Egg Yolk Agar (EYA), prodotto aggiungendo al Blood Agar Base N°2 (Oxoid) (BaB2) 50 ml/l di yolk solution, ottenuto a sua volta miscelando sterilmente 25 ml di tuorlo di uovo con 25 ml di soluzione fisiologica. I campioni sono stati incubati a 37 °C nelle stesse condizioni di anaerobiosi precedentemente descritte. Dopo 48 ore di incubazione le colonie sospette, di piccole dimensioni, lecitinasi positive, lipasi positive e debolmente emolitiche, sono state raccolte e trasferite in 10 ml di brodo FCMM, incubate a 37 °C per 48 ore e sottoposte a PCR per i tossinotipi A, B, C, D, E, F come già descritto. La ricerca dei tossinotipi mosaico C-D e D-C è stata effettuata mediante Macroarray secondo protocolli descritti da Woudstra et al. (2012).

La prova biologica per la ricerca della neurotossina (Mouse Lethality Assay - MLA) (CDC, 1998), è stata effettuata dai sieri ottenuti (0,4 ml e 0,2 ml) dai coaguli prelevati dalle cavità cardiache dei due germani reali, mentre il campione prelevato dal piro piro è risultato insufficiente per poter eseguire il test. La prova biologica è stata inoltre effettuata anche dai surnatanti delle brodoculture ottenute dalle colonie sospette e risultate positive in PCR, filtrate con carta da filtro (0,45 mm) (Millipore, Tullagreen, Ireland).

I virus della Malattia di Newcastle e dell'Influenza aviaria sono stati ricercati, a partire dai campioni di cervello, mediante Multiplex - PCR con protocolli già descritti in bibliografia (Pang et al., 2002).

Sono stati infine allestiti, dai campioni di fegato e sangue del cuore, esami batteriologici *di routine* su terreni selettivi (MacConkey Agar, Oxoid) e arricchiti (TSA, Oxoid), incubati in aerobiosi a 37 °C per 24 ore.

RISULTATI

All'esame autoptico, non venivano rilevate particolari lesioni macroscopiche, ad eccezione di fenomeni congestizi generalizzati (Foto 1). Il tratto gastroenterico risultava praticamente vuoto nei due germani reali, mentre erano presenti solo piccole quantità di materiale alimentare nello stomaco del piro piro.



Foto 1: Congestione a carico dei reni

Inoltre, nel germano reale rinvenuto già deceduto, si evidenziava anche un ispessimento del sacco aereo toracico sinistro con presenza di qualche lacinia fibrinosa (Foto 2).



Foto 2: Congestione polmonare e presenza di essudato fibrinoso

Esami di laboratorio

La ricerca dei virus della Malattia di Newcastle e dell'Influenza aviaria dai campioni di cervello ha dato esito negativo. Le indagini batteriologiche di *routine* hanno portato all'isolamento di *Escherichia coli* dal sacco aereo toracico sinistro del germano reale in cui era stato rilevato in quella sede, durante l'autopsia, il deposito di fibrina.

I brodi di arricchimento inoculati con i campioni di fegato ed intestino sono risultati positivi per *C. botulinum* di tipo C mediante PCR. Le indagini svolte mediante Macroarray hanno consentito di caratterizzare la tossina come mosaico di tipo C/D.

La prova biologica è risultata positiva per il siero di germano reale utilizzato in quantitativo maggiore (0,4 ml), che è stato neutralizzato dall'antitossina C, mentre è risultata negativa per il secondo siero, in quantitativi pari a 0,2 ml. Analogamente, le prove effettuate dai surnatanti delle colonie sospette hanno permesso di individuare la tossina C.

DISCUSSIONE

Il focolaio di botulismo osservato nell'oasi di Torre Guaceto è stato causato dalla tossina mosaico C/D. Nei volatili selvatici, il tipo C è il botulismo principalmente riscontrato così come riportato nella maggior parte delle segnalazioni scientifiche (Defilippo et al., 2013; Neimanis and Speck, 2012). Recentemente, il ricorso a metodiche più sensibili rispetto a quelle spesso utilizzate ha tuttavia permesso di evidenziare la diffusione del tossinotipo C/D nell'avifauna europea (Vidal et al. 2013; Woudstra et al. 2012).

Nel corso delle indagini svolte nel caso del focolaio descritto, la tossina individuata è risultata inizialmente, sia in PCR che nel corso delle prove biologiche, una tossina di tipo C. Successivamente, l'analisi in Macroarray ha permesso di classificare più correttamente la tossina come tossinotipo C/D. Questo evidenzia l'importanza di individuare ed utilizzare metodiche sempre più accurate e sensibili, in modo da arrivare ad una più corretta classificazione dei germi e delle tossine responsabili dei casi di patologia osservati. Sia la prova biologica che la maggior parte dei protocolli di PCR descritti in letteratura non discriminano tra la tossina C e la tossina mosaico C/D (Woudstra et al. 2012). Non è da escludere che la negatività del siero di uno dei due germani reali evidenziata nel corso della prova biologica sia stata legata allo scarso quantitativo del siero stesso, e quindi della tossina. Infatti, MLA è un test che non è molto sensibile a bassi quantitativi di tossina (Le Maréchal et al. 2016).

Diversi fattori possono aver portato nell'area naturale ad un incremento ambientale della tossina. Le temperature medie in concomitanza con l'insorgenza del focolaio si aggiravano intorno ai 30 °C, temperatura ottimale per la replicazione di *C. botulinum* e per la produzione della tossina (Rocke and Bollinger, 2007). Questo è uno dei motivi per cui si osserva un incremento dei casi di botulismo nel periodo estivo ed all'inizio dell'autunno (Woo et al., 2010).

Considerando che la presenza di materiale organico facilita la produzione della tossina C/D (Anza et al. 2014), la moria di pesci avvenuta nella vasca artificiale potrebbe aver giocato un importante ruolo, incrementando nell'ambiente la quantità di materiale in decomposizione. Inoltre, sebbene i pesci deceduti non siano stati analizzati ed i pesci siano generalmente ritenuti reservoir della tossina botulinica di tipo E (Rocke and Bollinger, 2007), non si può escludere che abbiano avuto anche un ruolo diretto nel caso di botulismo descritto, considerando che è stato evidenziato che alcuni pesci, come la tilapia (*Oreochromis mossambicus*), possono essere fonte di tossina C per i pellicani (Nol et al. 2004), e che sono stati riportati casi di botulismo di tipo C che hanno coinvolto numerosi pellicani, aironi ed altri volatili ittivori (Rocke et al., 2004; Neimanis et al., 2007). Le larve di ditteri sono considerate, dal punto di vista epidemiologico, importanti nel botulismo dei selvatici in quanto fungono da concentratori di tossina e possono veicolarla ai volatili che le assumono cibandosene (Rocke and Bollinger, 2007). Tuttavia, nel caso descritto, non sono state riscontrate nel tratto gastroenterico di nessuno dei volatili esaminati e pertanto si ritiene che non abbiano avuto un ruolo importante.

CONCLUSIONI

Il caso descritto rappresenta la prima descrizione in Italia di un focolaio di botulismo osservato nell'avifauna selvatica indotto dalla tossina mosaico C/D. Considerando che recentemente è stata evidenziata la presenza di *C. botulinum* di tipo C/D in campioni fecali di volatili acquatici (Anza et al. 2016), le specie migratrici possono aver contribuito a disseminare il germe nell'oasi, con l'insorgenza del focolaio quando sono subentrate le condizioni ambientali ottimali per il batterio e per la produzione della tossina.

BIBLIOGRAFIA

Anza I, Vidal D, Feliu J, Crespo E, Mateo R. (2016). Differences in the Vulnerability of Waterbird Species to Botulism Outbreaks in Mediterranean Wetlands: an Assessment of Ecological and Physiological Factors. *Appl Environ Microbiol* 82:3092-3099.

Anza I, Vidal D, Laguna C, Díaz-Sánchez S, Sánchez S, Chicote Á, Florín M, Mateo R. (2014). Eutrophication and Bacterial Pathogens as Risk Factors for Avian Botulism Outbreaks in Wetlands Receiving Effluents from Urban Wastewater Treatment Plants. *Appl Environ Microbiol* 80:4251–4259.

Centers for Disease Control and Prevention. (1998). Botulism in the United States, 1899–1996. In: *Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers*. US Department of Health and Human Service, Atlanta, GA, CDC; pp. 1-42.

De Medici D, Anniballi F, Wyatt GM, Lindstrom M, Messelhoefer U, Aldus CF, Delibato E, Korkeala H, Peck MW, Fenicia L. (2009). Multiplex PCR for detection of botulinum neurotoxin-producing clostridia in clinical, food, and environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 75:6457-6461.

Defilippo F, Luppi A, Maioli G, Marzi D, Fontana MC, Paoli F, Bonilauri P, Dottori M, Merialdi G. (2013). Outbreak of type C botulism in birds and mammals in the Emilia Romagna region, Northern Italy. *J Wildl Dis* 49: 1042–1046.

Le-Maréchal CL, Ballan V, Rouxel S, Bayon-Auboyer MH, Baudouard MA, Morvan H, Houard E, Požvevara T, Souillard R, Woudstra C, Le Bouquin S, Fach P, Chemaly M. (2016). Livers provide a reliable matrix for real-time PCR confirmation of avian botulism. *Anaerobe* 38: 7-13.

Neimanis A, Gavier-Widén D, Leighton F, Bollinger T, Rocke T, Mörner T. (2007). An outbreak of type C botulism in herring gulls (*Larus argentatus*) in Southeastern Sweden. *J Wildl Dis* 43:327-336.

Neimanis A, Speck S. (2012). Clostridium species and botulism. In: *Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe*. Gavier-Widén D, Duff JP, Meredith A, editors. John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK, pp. 417-427.

Nol P, Roche TE, Gross K, Yuill TM. (2004). Prevalence of neurotoxic *Clostridium botulinum* type C in the gastrointestinal tracts of Tilapia (*Oreochromis Mossambicus*) in the Salton sea. *J Wildl Dis* 40:414-419.

Pang Y, Wang H, Girshick T, Xie Z, Khan MI. (2002). Development and application of a multiplex polymerase chain reaction for avian respiratory agents. *Avian Dis* 46:691-699.

Pullar E.M. (1974). Enzootic botulism amongst wild birds. *Aust Vet J*; 10 (4): 128-35

Roche TE, Bollinger TK. (2007). Avian botulism. In: *Infectious diseases of wild birds*, Thomas T, Hunter DB, Atkinson CT, editors. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 377-416.

Roche TE, Nol P, Pelliza C, Sturm K. (2004). Type C botulism in pelicans and other fish-eating birds at the Salton Sea. *Stud Avian Biol* 27:136-140.

Szyfres B., Trechi H., Abaracon D. 1948. Entoxicacion botulinica en patos. *Rev Med Vet* (Montevideo, Uruguay) 6: 818-24.

Vidal D, Anza I, Taggart MA, 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. *Appl Environ Microbiol* 79: 4264–4271.

Woo G, Kim H, Bae Y, Jean YH, Yoon Y, Bak E, Hwang E, Joo Y. (2010). Outbreak of botulism (*Clostridium botulinum* type C) in wild waterfowl: Seoul, Korea. *J Wildl Dis* 46:951-955.

Woudstra C, Skarin H, Anniballi F, Fenicia L, Bano L, Drigo I, Koene M, Bâyon-Auboyer MH, Buffereau JP, De Medici D, Fach P. (2012). Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe. *Appl Environ Microbiol* 78:3120–3127.