

## EPISODIO DI BOTULISMO IN POLLI DA CARNE: RILIEVI DIAGNOSTICI

Bano L. <sup>1</sup>, Giovanardi D. <sup>2</sup>, Morandini E. <sup>3</sup>, Tonon E. <sup>1</sup>, Drigo I. <sup>1</sup>, Bonci M. <sup>1</sup>, Agnoletti F. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso

<sup>2</sup>Laboratorio Tre Valli. San Michele Extra, Verona

<sup>3</sup>Agricola Tre Valli. San Martino Buon Albergo, Verona

### **ABSTRACT - Botulism in broiler chickens: diagnostic findings.**

An outbreak of Type C botulism in 45 days old broilers was observed. Diagnosis was made on the basis of clinical findings, mouse bioassay, PCR results and *C. botulinum* type C isolation. Since 2008 an increase of type C botulism outbreaks in broiler chickens has been observed in some European countries. In Sweden the PFGE patterns obtained from *C. botulinum* type C isolated in different farms suggest that the bacteria are derived from a common source. In this Italian outbreak the source of intoxication/infection has been investigated.

### **Introduzione**

Il botulismo è una grave patologia descritta nell'uomo e negli animali, causata dalle neurotossine prodotte da *Clostridium botulinum*, batterio Gram positivo, anaerobio obbligato, sporigeno, classificato in 7 tipi (A, B, C, D, E, F, G) in base alle caratteristiche antigeniche della tossina prodotta. Oltre a *C. botulinum* anche *Clostridium butyricum*, *Clostridium baratii* e *Clostridium argentinense* sono in grado di produrre neurotossine antigenicamente sovrapponibili, rispettivamente, a quelle di *C. botulinum* di tipo E, F e G. La neurotossina botulinica agisce inibendo il rilascio dell'acetilcolina a livello delle terminazioni nervose, inducendo la classica sintomatologia caratterizzata da paralisi flaccida. Il botulismo aviario può essere causato da *C. botulinum* tipo A, C, D, ed E, ma il tipo C è senza dubbio prevalente mentre nei casi umani il ruolo di questo tossinotipo è assolutamente trascurabile (Kaldhusdal and Jordan, 2008). I tipi C e D sono accomunati da un mosaico di componenti uguali per le due neurotossine e dal fatto che il gene codificante la neurotossina viene veicolato da batteriofagi. Il test di riferimento per la diagnosi di botulismo è il test di tossinoneutralizzazione condotto su topino (mouse test) (Lindström e Korkeala, 2006; CDC, 1998).

La maggior parte di episodi di botulismo che si verificano nel mondo coinvolgono gli uccelli selvatici e, tra questi, soprattutto gli anatidi. Non mancano segnalazioni di malattia nel pollo e nel tacchino, anche se la specie d'allevamento più frequentemente colpita da botulismo è il fagiano, dove, in virtù dello stato semibrado in cui viene allevato, può risultare difficoltoso individuare ed allontanare le fonti d'intossicazione costituite dai cadaveri e dalle larve di mosca carnaria che su questi si sviluppano (Kurazono et al., 1974; Kaldhusdal and Jordan, 2008). Nel pollo il botulismo può insorgere in seguito all'assunzione di cibi o acqua contaminati da tossina botulinica preformata (forma tossica) oppure attraverso l'entrata in circolo di tossina prodotta nell'apparato digerente (forma tossico-infettiva) o in una ferita infetta (botulismo da ferita) (Trampel et al., 2003; Dhoms et al., 1982; Kaldhusdal and Jordan, 2008; Zhang et al., 2006). In alcuni paesi europei, negli ultimi 2 anni, si è registrato un aumento delle segnalazioni di botulismo negli allevamenti di broiler (Adjou et al., 2009; Skarin et al., 2009) e tacchini (Hafez H.

M. 2010, comunicazione personale) ma senza che venga individuata una fonte precisa d'intossicazione.

## **Materiali e metodi**

### Dati anamnestici e campionamento

A Novembre 2009, in un allevamento lombardo di 120.000 broiler di 45 giorni, è stata osservata nel 2% degli animali la comparsa di una sintomatologia riconducibile a botulismo. I soggetti colpiti presentavano ptosi palpebrale e paralisi flaccida a carico della muscolatura degli arti inferiori, delle ali e del collo (limberneck) e la mortalità ha riguardato il 100% dei soggetti sintomatici.

All'inizio della sintomatologia il gruppo è stato trattato con amoxicillina. Da 16 soggetti con evidente sintomatologia paralitica sono stati prelevati campioni di sangue per la ricerca della tossina botulinica, mentre da 5 soggetti deceduti spontaneamente, sono stati prelevati i pacchetti intestinali per la ricerca di *C. botulinum* mediante esame culturale.

### Esame batteriologico

Porzioni intestinali prelevate da diversi distretti sono state introdotte in terreno d'arricchimento liquido Fortified Cooked Meat Medium (FCMM) preridotto (Iwasaki *et al.*, 1980). Le brodocolture di FCMM sono state sottoposte a shock termico (71 °C per 10 minuti) e incubate a 37 °C per 48 ore. Al termine dell'incubazione ciascuna brodocoltura è stata saggiata mediante PCR per la presenza di *C. botulinum* e i campioni positivi sono stati seminati nei seguenti terreni di coltura: Egg Yolk Agar (EYA), Blood Agar Base N°2 (Oxoid) (BAB2), Agar Sangue (AS) e FCMM. I terreni EYA e BAB2 sono stati incubati in cabina anaerobica (Bactron IV, Shellab) a 37 °C mentre le piastre di AS sono state incubate in condizioni di aerobiosi a 37 ° per verificare il grado di contaminazione da germi aerobi. Il secondo passaggio in FCMM ha subito lo stesso iter del primo. Dopo 48 ore di incubazione tutti i terreni sono stati ispezionati e le colonie sospette (lipasi e lecitinasi positive su EYA e debolmente emolitiche su BAB2) sono state risospese in terreno liquido FCMM e identificate tramite PCR per *C. botulinum*. Le brodocolture pure di *C. botulinum* sono state sottoposte alla ricerca di tossina botulinica secondo la procedura descritta di seguito.

### Ricerca tossina botulinica

Le brodocolture ed i sieri per la ricerca della tossina botulinica, sono stati preventivamente sottoposti a filtrazione con filtri da 0,45 µm (Millipore) al fine di escludere contaminazioni batteriche. Ciascun siero è stato utilizzato per la ricerca della tossina mediante prova di tossinoneutralizzazione su topino (mouse test) secondo quanto descritto in letteratura (CDC, 1998). Per i tipi C e D è stato usato siero iperimmune antibotulinico fornito dal CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA) mentre per i tipi A, B, E, F è stato impiegato un siero tetravalente fornito dal Centro di Riferimento Nazionale per il Botulismo (Istituto Superiore di Sanità, Roma).

### Ricerca mediante PCR dei geni codificanti le neurotossine botuliniche A, B, C, D, E ed F.

Il DNA è stato estratto a partire da 175 µl di brodocoltura utilizzando l'estrattore automatico Microlab Starlet (Hamilton) ed il kit MagMax Total Nucleic Acid Isolation (Ambion). La rilevazione dei geni *BoNT/C* e *BoNT/D* è stata effettuata attraverso una duplex PCR con primers specifici per i due geni codificanti le neurotossine botuliniche

C e D e utilizzando un controllo interno di amplificazione secondo quanto descritto da Bano *et al.* (2008). Per la rilevazione dei geni *BoNT/A*, *BoNT/B*, *BoNT/E* e *BoNT/F*, codificanti rispettivamente le neurotossine A, B, E ed F, è stata utilizzata una multiplex PCR con controllo interno di amplificazione secondo quanto descritto da De Medici *et al.* (2009). I controlli positivi impiegati per la PCR vengono riportati in tabella 1.

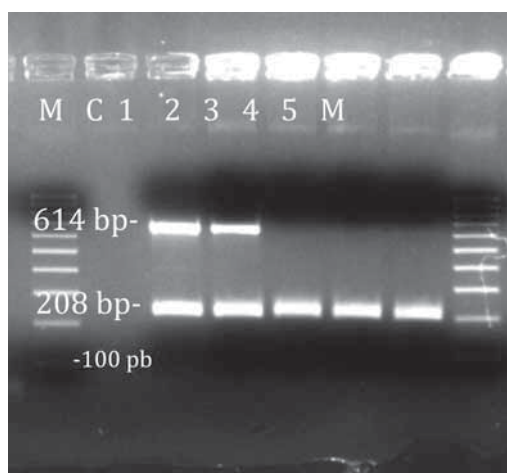
Ceppi di referenza	Neurotossina	Geni
<i>C. botulinum</i> ATCC 19397	A	<i>BoNT/A</i>
<i>C. botulinum</i> ATCC 27765	B	<i>BoNT/B</i>
<i>C. butyricum</i> ATCC 47435	E	<i>BoNT/E</i>
<i>C. botulinum</i> NCTC 10281	F	<i>BoNT/F</i>
<i>C. botulinum</i> CCUG 7970	C	<i>BoNT/C</i>
<i>C. botulinum</i> NCTC 8265	D	<i>BoNT/D</i>

**Tabella 1.** Controlli positivi impiegati per la PCR.

### Risultati

Dodici sieri su 16 sono risultati positivi per tossina botulinica di tipo C. Per 11 campioni la morte dei topini è avvenuta entro 24 ore dalla somministrazione mentre in 1 caso il decesso è avvenuto dopo 35 ore. Due dei 5 pacchetti intestinali conferiti sono risultati positivi alla PCR (fig. 1) per *C. botulinum* tipo C e da uno di questi il microrganismo è stato isolato al terzo passaggio su FCMM. Dopo aver verificato il mantenimento della tossicità e la purezza della coltura, le spore del ceppo isolato sono state lavate con soluzione fisiologica e stoccate a -80 °C per futuri studi epidemiologici.

I risultati di laboratorio ottenuti hanno confermato il sospetto di botulismo avanzato dal veterinario aziendale su base sintomatologica. La terapia approntata ha limitato le perdite che in altri focolai hanno raggiunto anche il 25% (Dohms *et al.*, 1982). L'indagine epidemiologica condotta in azienda non ha permesso di formulare alcuna ipotesi riguardo alla possibile fonte di contaminazione/ intossicazione.



**Figura 1.** Immagini dei prodotti di amplificazione dopo corsa elettroforetica in gel d'agarosio. M: marker (100 bp); C: controllo negativo; 1-2: campione positivo per *C. botulinum* tipo C (614 bp) e controllo interno d'amplificazione (208 bp); 3-4-5: campioni negativi e controlli interni d'amplificazione.

## Discussione e conclusioni

Il botulismo aviario è una malattia nota da tempo e per molti anni la sua diagnosi è stata affidata esclusivamente al test di tossinoneutralizzazione su topino che ancora oggi rimane il gold test per questa malattia, sebbene stiano sempre più diffondendosi test ELISA per la ricerca della tossina (Lindström and Korkeala, 2006). Nel presente focolaio non tutti i sieri dei soggetti sintomatici sono risultati positivi per neurotossina botulinica. Questo risultato potrebbe essere legato da un lato ai limiti di sensibilità del metodo e dall'altro a una mancanza di neurotossina circolante poiché già legata ai terminali colinergici. In questi casi il sostegno della biologia molecolare potrebbe rivelarsi utile soprattutto per determinare in tempi rapidi il tipo di *C. botulinum* implicato nel focolaio, informazione indispensabile nei casi di botulismo umano e dei grossi animali qualora si rendesse necessario intervenire rispettivamente con sieroterapia o con vaccinazione d'urgenza. Inoltre, come dimostrato nel presente episodio, la PCR è risultata molto utile per l'isolamento del ceppo di *C. botulinum* che potrà essere utilizzato per futuri studi epidemiologici su base genetica.

Per molti anni l'enterite necrotica da *C. perfringens* è stata considerata la malattia ad eziologia clostridica più diffusa nell'allevamento del pollo da carne. Ultimamente è stato registrato un aumento in Europa di altre 2 importanti patologie che in passato comparivano solo sporadicamente: la dermatite gangrenosa e il botulismo (Adjou *et al.*, 2009; Skarin *et al.*, 2009). Nel caso del botulismo questo incremento non riguarda solo il comparto avicolo ma anche gli allevamenti di vacche da latte e bovini da carne dove, in pochi mesi, tra il 2008 e il 2009, in Veneto, Trentino e Lombardia sono stati registrati 6 importanti focolai (Bano *et al.*, 2009). Le cause di questo incremento non sono note ma dovrebbero essere indagati eventuali fattori predisponenti comuni. E' auspicabile che questi vengano sempre diagnosticati con certezza e segnalati per consentire di ricostruire il quadro epidemiologico della malattia e permettere di indagarne le cause.

## Bibliografia

1. Adjou K. T., Maedes S., Danguy R., Brugere- Picoux J. 2009. Laboratory investigation of avian botulism in France. Atti del XVI World Veterinary Poultry Association Congress, 8-12 Novembre, Marrakesh, Marocco. Pag. 150.
2. Bano L., Anniballi F., Delibato E., De Medici D., Agnoletti F., Cocchi M., Drigo I., Magistrali C., Fontana M. C., Merialdi G., Arossa C., Fenicia L. 2008. Avian botulism in Italy: application of a duplex PCR assay as a useful tool for the isolation of neurotoxicogenic strains. Atti del convegno: *Clostridium botulinum*-epidemiology, diagnosis, genetics, control and prevention, 16-19 June, Helsinki, Finland.
3. Bano L, Schiavon E., Drigo I., Gaspari L., Zanette G., Brino A., Fenicia L., Anniballi F., Agnoletti F., Rampin F., Alberton A., Bonfanti L., Barberio A., Ferrarese A. 2009. Episodi di botulismo bovino nella regione Veneto: aspetti clinici e diagnostici. Rivista di Buiatria. 2:3-10.
4. CDC, 1998. Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for Epidemiologists, Clinicians and Laboratory Workers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA (<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/files/botulism.pdf>).

5. De Medici D., Anniballi F., Wyatt G.M, Lindstro M., Messelha"u"ber U., Aldus C.F., Delibato E., Korkeala H, Peck W, Fenicia L. 2009. Multiplex PCR for Detection of Botulinum Neurotoxin-producing Clostridia in clinical, food, and environmental samples. *Appl. Env. Microbiol.* 75(20): 6457-6461.
6. Dohms J. E., Allen P. H., Rosemberg J. K. 1982. Cases of type C botulism in broilers chickens. *Avian Diseses*, 26:204-210.
7. Galey F. D., Terra R., Walker R., Adaska J., Etchebarne M. A., Puschner B., Fisher E., Whitlock R. H., Rocke T., Willoughby D., Tor E. 2000. Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 12:204-209.
8. Iwasaki M., Ohishi I, Sakaguchi G. 1980. Evidence that botulinum C2 toxin has two dissimilar components. *Infect. Immun.*, 29:390-394.
9. Kaldhusdal M., Jordan F. T. W. *Clostridium botulinum* (botulism, limberneck). 2008. In: *Poultry Diseses*, 6<sup>th</sup> Edition. Pattison M., McMullin P. F., Bradbury J. M., Alexander D. J. Ed. Saunders, Elsevier. Pp.208-211.
10. Kurazono H., Shimozawa K., Sakaguchi G. Takahashi M., Shimizu T., Kondo H. 1974. Botulism among penned pheasants and protection by vaccination with C1 toxoid. *Res. Vet. Sci.*, 38:104-108.
11. Lindstr"om M., Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. 2006. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2):298–314.
12. Lindstr"om M., Keto R., Markkula A., Nevas M., Hielm S., Korkeala H. 2007. Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in food and fecal material. *Appl. Env. Microbiol.*, 67: 5694-5699.
13. Skarin H., Blomqvist G., Aspan A., Lindberg A., Baverud V. 2009. Comparative analysis of *Clostridium botulinum* type C isolates from botulism outbreaks in swedish broiler farms. *Atti del 6<sup>th</sup> ClostPath International Conference – Clostridia: the impact of genomics on disease control.* Roma, 19-23 Ottobre.
14. Zhang G., Mathis G. F., Darius S., Smith S. R., Ritchie S. J. 2006. A case of botulism in commercial broilers. *Proceeding of the 55<sup>th</sup> WPDC*, 5-8 marzo, Sacramento, CA, Usa.