



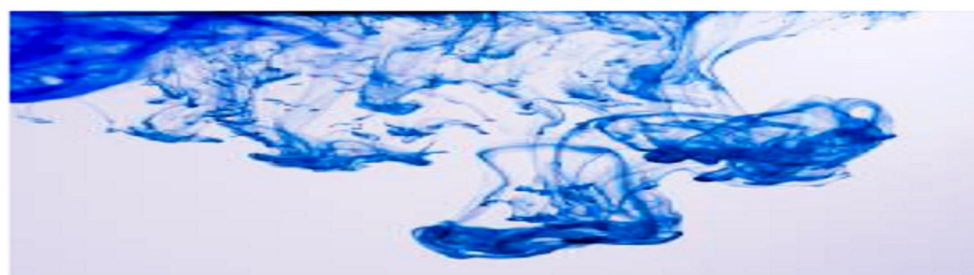
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

*Evento Formativo*

**L'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE  
PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:  
RICADUTA APPLICATIVA NELLE  
REALTÀ TERRITORIALI**



**9 giugno 2015**

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del  
Lazio e della Toscana M. Aleandri  
Sede di Roma, Via Appia Nuova 1411*



# **Botulismo negli uccelli acquatici : casi di studio e messa a punto di protocolli diagnostici per l'identificazione ed il monitoraggio di zone a rischio.**

**“ Ricerca finanziata dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali; Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti”.**

Responsabile Scientifico: Dr Teresa Bossù

E-mail: [teresa.bossu@izslt.it](mailto:teresa.bossu@izslt.it)





## INTRODUZIONE

- É causato dall'ingestione di una potente neurotossina (neurotossina botulinica [BoNT] ) prodotta dal *Clostridium botulinum* che produce paralisi flaccida e morte.
- É individuati sette tipi di tossina ( tipi da A a G ), il tipo C è quello più frequentemente coinvolto in casi di botulismo aviare
- É Recentemente, alcuni casi di botulismo animale in Europa ed in Giappone sono stati causati da mosaici di tossine tipo C e D , per i quali si osserva una maggiore attività letale nel topo rispetto ad altri tipi di BoNT , la **tossina mosaico C / D** sembra essere predominante negli uccelli acquatici europei e cross- reagisce con gli antisieri per tipo C comunemente usati per il mouse test





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana

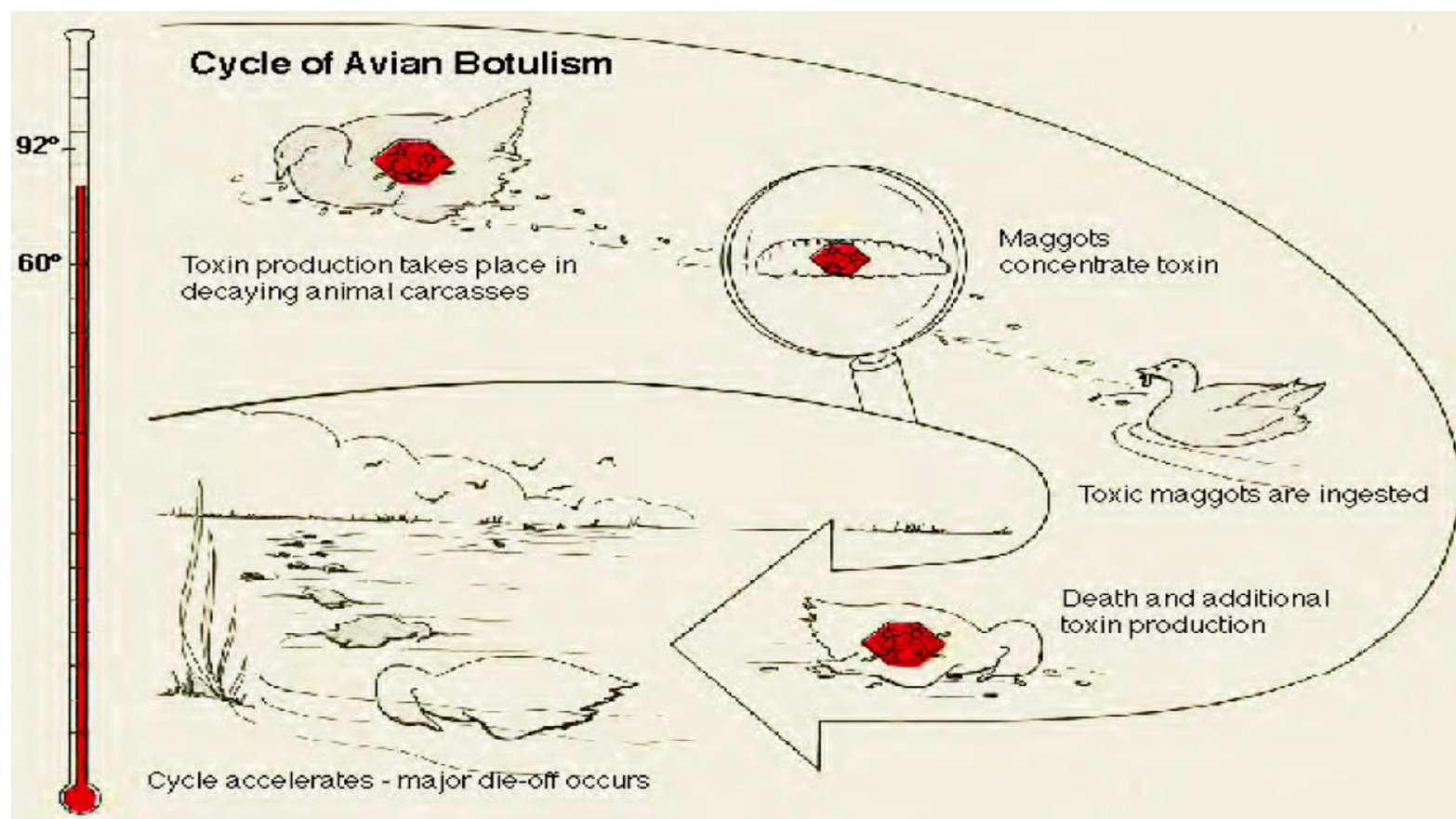


## INTRODUZIONE

- É Il *Clostridium botulinum* tipo C non è considerato strettamente un patogeno, ma agisce come un batterio saprofita che utilizza una neurotossina ( BoNT ) per uccidere al fine di creare un terreno appropriato per il suo mantenimento.
- É La mortalità esponenziale osservata durante le epidemie di botulismo aviare è stata associata al ciclo di vita di mosche necrofaghe e le loro larve.





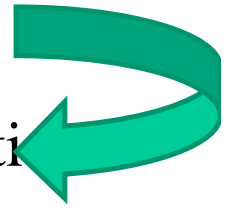


**Fig 8** - The proposed method of the carcass-maggot cycle. Sea Grant (2002). *Botulism in Lake Erie Workshop Proceedings*. New York Sea Grant, Ohio Sea Grant, and Pennsylvania Sea Grant.  
<http://www.seagrantsunysb.edu/botulism/pdfs/Botulism-Proc02.pdf>



## FATTORI PREDISPONENTI

- É Abbondanza di spore di *C. botulinum* nell'ambiente
- É può a sua volta dipendere dal terreno locale, dai sedimenti e dalle proprietà fisico-chimiche dell'acqua.
- É Le temperature elevate nelle zone umide
- É Le mortalità degli uccelli dovute ad altre cause (fornendo carcasse dove *C. botulinum* può crescere e avviare un focolaio) .
- É la suscettibilità di alcune specie di uccelli o individui alla tossina BoNT.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Nell'estate-autunno del **2008** 3 focolai (di tipo C) nella Regione Lazio, in particolare lago di Albano (area del Parco Naturale dei Castelli Romani), Tenuta Presidenziale di Castel Porziano e Laghi Lungo e Ripasottile (Riserva naturale in provincia di Rieti,) con diverse specie di uccelli colpite quali Anatidi, Ardeidi e Laridi. Nel **2009**, sempre nel periodo estivo autunnale, episodi attribuibili a botulismo C si sono verificati nelle Riserve Naturali di Torre Flavia e Macchia Tonda (Roma), nella Tenuta Presidenziale di Castel Porziano e lago di Albano. Nel **2010**, gabbiani morti per botulismo C sono stati rinvenuti presso la riserva naturale di Torcaldara, il litorale di Anzio ed il lago di Bracciano.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



A seguito di ciò si è ritenuto opportuno avviare una ricerca con i seguenti obiettivi:

- **Determinare** l'estensione del fenomeno sulla base delle condizioni geografiche ed ambientali esistenti al momento dell'insorgenza.
- individuare indicatori microambientali per la classificazione di zone potenzialmente endemiche per botulismo aviario tipo C ed E
- **Valutare** la di presenza della tossina all'interno della catena trofica ed il conseguente possibile rischio per la salute pubblica, anche a livello di produzione primaria delle zone potenzialmente endemiche.
- **Mettere a punto** e validare metodiche ai fini dell'accreditamento per la diagnosi di botulismo aviario e la ricerca delle tossine in campioni ambientali ed nei potenziali "carrieri" (pesci, molluschi ecc.) che possano sostituire il mouse test.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



# Caratterizzazione delle zone

Il **Lago Albano**, chiamato anche *Lago di Castelgandolfo* o (in modo contestato da alcuni) *Lago di Albano*, trae il suo nome dal latino "lacus Albanus"; ai tempi dell'ascesa politica di Roma antica, si trovava nei pressi della città di Alba Longa. È un lago vulcanico a sud di Roma (Altitudine: ca. 250m; Latitudine: 41° 45'; longitudine: 12° 40'). Ha una forma quasi perfettamente ovale; ha una circonferenza di circa 10 km. Si tratta del lago più profondo nel Lazio (170 m).

Anche se in età antica era stato costruito un emissario artificiale, come tutti i laghi vulcanici, il lago Albano non dispone di fiumi immissari o emissari che possano garantire un consistente ricambio idrico, è alimentato da piogge, sorgenti superficiali (Acqua S.Leonardo, Acqua Acetosa e Culla del Lago) e sorgenti profonde.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Occupa una superficie di circa 600 ettari e si trova a 293 metri s.l.m. Le misure sono:

- lunghezza della cinta craterica: 4500 metri
- lunghezza dello specchio d'acqua: 3500 metri
- larghezza massima: 2750 metri
- profondità massima: 170 metri
- perimetro: 10000 metri.

Il volume del bacino imbrifero è di circa 1900 milioni di metri cubi. La massa d'acqua attualmente è di 450 milioni di metri cubi.

Il lago Albano costituisce dal punto di vista ambientale un caso speciale: infatti, il bordo del cratere lo rende una sorta di microcosmo isolato dal paesaggio circostante. Tra gli anni '60 e oggi, il livello delle acque si è abbassato di quasi 4 metri. Il fenomeno è dovuto principalmente al consumo d'acqua dovuto all'aumentata urbanizzazione dei dintorni ed al conseguente sovrasfruttamento della falda acquifera albana. Per di più, la riva è afflitta da seri problemi di inquinamento (ossigeno disciolto nell'acqua, coliformi, rifiuti dispersi nell'ambiente), per cui vige molto spesso il divieto di balneazione in varie zone della riva.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Il **Lago di Bracciano**, originariamente chiamato anche Lago Sabatino (latino: Lacus Sabatinus), è un lago di origine vulcanica situato nel nord della provincia di Roma. La sua superficie è di 57,5 km<sup>2</sup> mentre la sua profondità massima di 164 metri). Occupa un insieme di cavità crateriche dei monti Sabatini ed è alimentato da un modesto bacino imbrifero di circa 150 km<sup>2</sup>. Ha come immissari varie sorgenti sotterranee tra cui quelle termominerali di Vicarello, e due emissari: l'Arrone, che riversa nel Tirreno lo scolmo del lago, e l'acquedotto Paolo, che porta a Roma l'acqua omonima alimentando anche fontane e giardini della città del Vaticano. Il lago ricade nel comprensorio del Parco Naturale Regionale del complesso lacuale di Bracciano e Martignano. Dal 1987, è stata vietata la navigazione a motore e l'uso di fertilizzanti e pesticidi.

Nei primi anni '80 sono stati realizzati una rete fognaria circumlacuale ed un impianto di depurazione. La rete fognaria corre lungo tutto il perimetro del lago per circa 30 chilometri ed è costituita da 24 stazioni di pompaggio. L'impianto di trattamento delle acque reflue è in grado di trattare una portata media giornaliera di 0,12 m<sup>3</sup>/s, con una popolazione servita pari a 40.000 abitanti. L'impianto che serve i comuni di Anguillara, Bracciano, Trevignano e Manziana, è sito in località Cesano (Roma) ed è in corso di potenziamento.





**Tabella 1: principali caratteristiche morfologiche ed idrochimiche dei laghi vulcanici presi in esame**

lago					bacino imbrifero				idrochimica	
Ambiente	Superficie (SL) (km <sup>2</sup> )	Altitudine media (m s.l.m.)	Profondità massima (m)	Volume (m <sup>3</sup> 10 <sup>6</sup> )	Tempo di ricambio (anni)	Superficie (SB) (km <sup>2</sup> )	Quota massima (m s.l.m.)	SL/SB	Cond (μS/cm 20°C)	pH
Albano	6.0	293	170	464.3	47.6	9.7	556	0.62	450	7.53
Bracciano	57.5	164	160	4950.0	137.0	149.0	612	0.39	484	8.23

database LIMNO (Tartari et al., 2004)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



La riduzione del livello delle acque è un problema pressante legato al tipo di sfruttamento. I laghi vulcanici rappresentano il 56% delle superfici lacustri di origine naturale dell'Italia centro-meridionale. Il restante 44% è composto in termini numerici da piccoli bacini concentrati soprattutto nel Lazio (che risulta la regione più ricca di laghi a sud delle alpi) e in termini superficiali dal grande bacino del lago Trasimeno che da solo rappresenta il 37% delle superfici di acqua dolce. Da un punto di vista volumetrico il distretto lacustre vulcanico conta 14.8 km<sup>3</sup> di acqua, ovvero il 95% della riserva idrica naturale del centro-sud. Questi dati rendono evidente anche l'importanza economica dell'acqua dei laghi vulcanici che attualmente viene sfruttata da migliaia di persone, principalmente per scopi agricoli e alimentari. Il problema dello sfruttamento idrico interessa in misura più o meno grave tutti i laghi vulcanici. Il bilancio idrico dei diversi laghi deve tenere conto di un'evaporazione naturale superiore a 1100 mm/anno (Dragoni & Valigi, 1994) che deve essere compensata con l'apporto idrico di un bacino idrografico molto ridotto.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Le oscillazioni delle acque sono un problema per il lago di Bracciano. Sfruttato già in epoca imperiale, con la costruzione dell'acquedotto Traiano (110 d.C.), il lago ha subito una riduzione del livello di circa 18 centimetri all'anno nel decennio 1998-2008 (Medici & Rinaldi, 2008) con conseguenza che potevano incidere fortemente sulle dinamiche costiere (Rossi, 2006). Le cause dell'abbassamento del livello delle acque non furono studiate nel dettaglio e probabilmente furono causate da una concomitanza di fattori climatici (diminuzione delle precipitazioni e aumento delle temperature medie dei mesi più freddi) e antropici (aumento nello sfruttamento della risorsa idrica). Furono studiate nel dettaglio le conseguenze biologiche di tale abbassamento con un'analisi dell'effetto che ebbe sulla copertura macrofitica e il conseguente impatto sulla fauna macrobentonica (Mastrantuono et al., 2008). Nel triennio 2008-2011 il lago di Bracciano ha recuperato gran parte del volume di acqua perduto.

Albano presenta la situazione più preoccupante: ha subito un abbassamento della superficie di oltre 4 metri dagli anni '60 (Ellwood et al., 2009), concentrato nel ventennio 1984-2003 (2.78m - in Medici, 2005). Il trend di diminuzione non si è arrestato e continua tutt'ora, come dimostrato dalle ortofoto consultabili on-line su motori GIS come google earth (fig. 2.5).







Figura 1 : avanzamento della linea di costa al lago Albano nel periodo 2001-2008. Il particolare fa riferimento ad una zona della spiaggia a NW del bacino, dove le pendenze sono minime e quindi l'avanzamento della linea di costa è massimo.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Durante i focolai Sono stati condotti sopralluoghi da parte di personale dell'IZSLT presso il Lago di Albano ed il lago di Bracciano, nel corso dei quali sono stati campionati oltre che carcasse di uccelli, anche larve di ditteri saprofagi (bigattini) presenti sulle stesse e terriccio in loro prossimità, al fine di sottoporre i suddetti campioni alla ricerca di tossina botulinica. Sono stati rilevati, tramite sonda, pH, temperatura e ossigeno disciolto nell'acqua in diversi punti, allo scopo di verificare le condizioni ambientali idonee allo sviluppo ed alla circolazione della tossina botulinica. Durante i picchi epidemici il costante monitoraggio delle aree colpite, ad opera anche dei guardia parco, ha consentito di osservare anche animali sintomatici, che , successivamente venuti a morte sono stati conferiti al laboratorio.

Gli uccelli sintomatici presentavano incapacità di volare, paralisi flaccida degli arti, opistotono, difficoltà respiratorie e paralisi della membrana nittitante. Sui soggetti rinvenuti morti o sintomatici preagonici e successivamente deceduti, è stato effettuato l'esame anatomopatologico ed il prelievo del fegato, del rene e dell'intestino per la ricerca del batterio e della tossina; sono stati inoltre effettuati esami batteriologici, virologici e tossicologici per escludere altre cause di morte.







le







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Lo sviluppo di un metodo di PCR ha previsto le seguenti fasi operative:

- ricerca e allineamento delle sequenze genomiche di interesse;
- disegno dei primers e delle sonde;
- valutazione *in silico* della specificità dei primers e delle sonde;
- messa a punto del protocollo *in vitro*, mediante ottimizzazione dei parametri termici e chimici del protocollo;
- determinazione delle performances del protocollo;
- validazione *in house* del protocollo mediante comparazione con un metodo utilizzato come riferimento.

Per la contemporanea ricerca e identificazione della tossina botulinica (mouse test) e del *C. Botulinum* con metodo microbiologico è stato utilizzato quello descritto dal CDC (Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians and laboratory workers. CDC 1998, 15 ó 21)



PRELIEVO CAMPIONI (MORIA UCCELLI ACQUATICI) ricerca botulismo aviare

DATA

EFFETTUATO DA

Coordinate punto di prelievo	Longitudine Est	Latitudine Nord

Denominazione punto di prelievo	
---------------------------------	--

Temperatura dell'acqua °C	
PH acqua	
Ossigeno disciolto	

UCCELLI ACQUATICI:

specie	N°

PESCI n°

SAPROFAGI da carcassa di : uccelli ☐ n°

Pesci ☐ n°

FANGHI

ACQUA

Informazioni epidemiologiche

Specie ( di pesci o uccelli o altro	Punto di campionamento	Morti (n°)	Altre info

Se possibile documentazione fotografica





## Risultati

Parametro	Real-time PCR probe
Selettività	Inclusività 100%
	Esclusività 100%
Range dinamico	Almeno 6 logaritmi per ogni target
LOD	<i>bont/C</i> 58 copie genomiche
	<i>bont/D</i> 43 copie genomiche
	<i>bont/CD</i> 58 copie genomiche
	<i>bont/DC</i> 221 copie genomiche
Accuratezza relativa	100%
Sensibilità relativa	100%
Specificità relativa	100%

Performances del protocollo di real-time PCR sviluppato

La validazione del metodo mediante ring trial con i 15 laboratori partecipanti ha dimostrato che la maggior parte dei laboratori è stata capace di eseguire correttamente il metodo proposto e di determinare correttamente i vari target in tutte le matrici assegnate.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Nei diversi focolai le specie pervenute presso i nostri laboratori sono state Gabbiano reale (*Larus michahellis*), Gabbiano comune (*Larus ridibundus*), Germano reale (*Anas platyrhynchos*), Anatra bianca, Oca domestica (*Anser anser*). Le carcasse si trovavano a diversi stati di conservazione e non sempre è stato possibile effettuare un esame necroscopico; dove possibile le **lesioni evidenziate si sono dimostrate come da bibliografia altamente aspecifiche e consistevano in uno stato congestizio degli organi interni, principalmente polmoni, fegato e reni. Altro reperto necroscopico frequentemente riscontrato è stato l'assenza di contenuto alimentare nelle prime vie digerenti e nello stomaco.**



Tabella.3- Campioni analizzati per tossina botulinica nei diversi focolai

Anno	2011	2012			
Zona	Bolsena	Camaione	Albano	Tor Caldara	Bracciano
Specie/matrice	N° Campioni				
Germano reale		2		2	3
anatre	2		2		1
Cornacchia			1		
Gabbiano	2			69	3
Cefali				10	5
Fito zoo plancton			3		2
<i>Lucilia</i> sp.			4		3
<i>Sarcophaga</i> sp.			2		1
<i>Musca</i> sp.			1		
<i>Fannia</i> sp.			5		
Larve dittero da gabbiano					2
Terriccio			10		10



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Per quanto concerne i parametri chimico fisici dell'acqua superficiale, rilevati durante i sopralluoghi sul lago di Albano e sui lago di Bracciano, questi erano: **pH 8,5, temperatura 22-24°C, ossigeno disciolto 0,2-0,7ppm**. In tutte le aree interessate da focolai, con l'eccezione di Castel Porziano e Bracciano, è stata riportata anche la contemporanea presenza di pesci morti. Nei periodi in cui si sono verificati i focolai, il lago di Albano era inoltre interessato da un evidente abbassamento del livello dell'acqua.





**Tabella.4 ó Risultati della ricerca di tossina botulinica e Clostridium botulino tipo C in uccelli ed altre matrici provenienti dai focolai**

Specie/Matrice	Totale	Positivi
Germano reale	7	5
Anatre	5	3
Gabbiano	74	25
Cornacchia	1	0
Cefali	15	0
Fito zoo plancton	5	0
<i>Lucilia</i> sp. (larve)	7	6
<i>Sarcophaga</i> sp. (larve)	3	3
<i>Musca</i> sp. (larve)	1	1
<i>Fannia</i> sp. (larve)	5	4
Larve dittero da gabbiano	2	2
Terriccio	20	10







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Il verificarsi di epidemie ricorrenti negli ultimi anni, unitamente ai risultati del presente lavoro, sembrano indicare che in Italia centrale si siano ormai instaurate condizioni climatiche favorevoli allo sviluppo della tossina botulinica nei mesi più caldi dell'anno, in aree umide con caratteristiche ambientali idonee. In particolare sembra che condizioni di siccità, innalzamento del pH dell'acqua e la diminuzione dell'ossigeno disciolto, favoriscano l'insorgenza di epidemie. La mancanza di dati relativi all'entità numerica delle popolazioni delle diverse specie aviarie coinvolte non ha, al momento, consentito un'indagine sull'eventuale impatto del botulismo sulle medesime popolazioni.

Nei focolai in cui sono stati coinvolti solo i gabbiani è risultato difficile definire l'epicentro del focolaio stesso; è noto, infatti, che questi uccelli compiono giornalmente spostamenti, anche su distanze notevoli. Pertanto, non si può escludere che abbiano contratto il botulismo in zone diverse da quelle ove siano poi stati rinvenuti morti. Interessante appare il riscontro della tossina botulinica anche in larve di diversi generi di ditteri saprofagi: i risultati ottenuti permettono, infatti, di confermare il loro ruolo come veicolo della tossina per via alimentare dalle carcasse su cui si nutrono ad esemplari di avifauna che le utilizzino come fonte alimentare.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



La PCR si è dimostrata essere uno strumento sensibile per la rilevazione di *C. botulinum* nell'ambiente e il suo studio eco epidemiologico. In generale, gli uccelli selvatici più frequentemente colpiti da botulismo sono uccelli acquatici e uccelli limicoli. Nel nostro studio , il 60,3 % dei decessi registrati sono stati per la famiglia Anatidi La specie più colpita è stato il germano reale , che ha rappresentato 50 % della mortalità riportata. L'anatra germano reale è una delle specie più abbondanti zone umide nella nostra area di studio e altrove , e quindi, comunemente subisce perdite durante le epidemie di botulismo. I focolai di botulismo sono un problema particolarmente significativo quando colpiscono le specie in via di estinzione con distribuzione locale o globale limitata .In linea di principio, un focolaio di botulismo aviario è essenzialmente imprevedibile, ma è ormai noto che diversi fattori ambientali svolgono un ruolo predisponente nelle epidemie . Questi fattori includono la temperatura, salinità del substrato, pH, potenziale redox, livello di ossigeno disciolto e contenuto di sostanza organica nei sedimenti / suolo. Inoltre, grandi epidemie sono favorite dalla presenza carcasse di uccelli intossicati di botulismo e le larve che si nutrono degli stessi.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



Gli Invertebrati, soprattutto larve di mosche necrofaghe , svolgono un ruolo cruciale nei focolai di botulismo come veicoli per la tossina BoNT che poi provoca mortalità negli uccelli che si nutrono degli stessi insetti. Hubalek e Halouzka hanno analizzato vari invertebrati durante un focolaio di botulismo e rilevato BoNT ad alte concentrazioni in larve e pupe di insetti necrofagi *Lucilia sericata* e *Calliphora vomitoria* che sono stati raccolti da carcasse di uccelli. A sua volta , il rischio di mortalità a causa di botulismo aviario tende a essere più elevato nelle zone umide con maggiore densità di carcasse cariche di larve . Duncan e Jensen hanno confrontato la tossicità di diverse specie di invertebrati raccolti da carcasse e ancora una volta scoperto che le larve di *Calliphoridae* ( raccolte da carcasse ) rappresentano il rischio maggiore . La tossicità è stata analizzata anche in insetti adulti, e 4 su 15 campioni di mosche *Calliphoridae* erano positivi per tossina botulinica . La prevalenza complessiva di *C. botulinum* nel tratto digerente di carcasse di uccelli raccolti durante le epidemie di botulismo è stato del 38,5 % ,ed è stato più frequentemente rilevata nel tratto inferiore ( intestino cieco ) rispetto al tratto superiore ( contenuto gastrico ) . Questa differente





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana



distribuzione può riflettere la preferenza di *C. botulinum* tipo C per il tratto inferiore ( specialmente il cieco ) per la crescita postmortem dei batteri . In alternativa, può riflettere la sua presenza premortem. La presenza di *C. botulinum* tipo C nel tratto digestivo degli uccelli può essere spiegata con l'ingestione di cellule vegetative e / o spore; Inoltre , i batteri possono persistere nel

cieco di animali sani che può agire come substrato per produzione la tossina dopo la morte. Abbiamo notato che tamponi cloacali possono dare risultati simili a campioni cieco in termini di rilevazione di *C. botulinum*. Questo potrebbe indicare che i tamponi cloacali potrebbero essere il campione di scelta negli uccelli vivi sospettati di botulismo o potrebbe essere usato per studiare possibili portatori del microrganismo in studi epidemiologici.

