



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Regioni Lazio e Toscana



Il supporto dell'IZSLT alla gestione delle attività sanitarie sul lago Albano: botulismo aviare

Diagnosi di botulismo animale presso la DO Controllo Alimenti.

Attività future: Progetto ANIWHIA ANIBOTNET

29 novembre 2016 - Roma



- Causato dall'ingestione di una potente neurotossina (neurotossina botulinica [BoNT]) prodotta dal *Clostridium botulinum* che produce paralisi flaccida e morte.
- Individuati sette tipi di tossina (tipi da A a G), il tipo C è quello più frequentemente coinvolto in casi di botulismo aviare
- 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



- 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.
- La mortalità esponenziale osservata durante le epidemie di botulismo aviario è stata associata al ciclo di vita di mosche necrofaghe e delle loro larve.



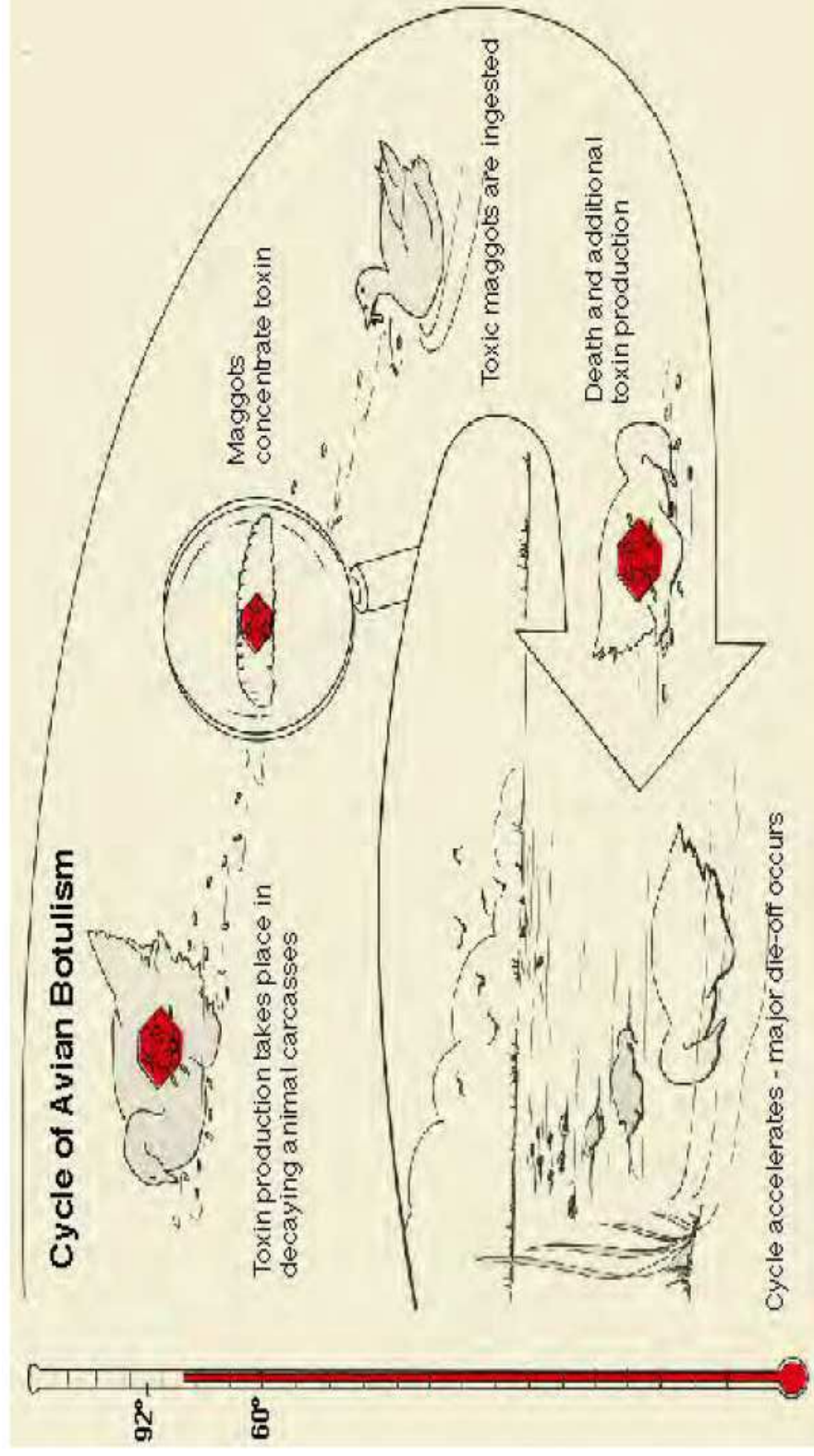
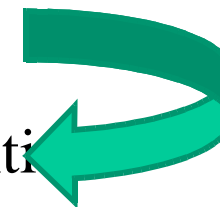


Fig 8 - The proposed method of the carcass-maggot cycle. Sea Grant (2002). *Botulism in Lake Erie Workshop Proceedings*. New York Sea Grant, Ohio Sea Grant, and Pennsylvania Sea Grant. <http://www.seagrantsunysb.edu/botulism/pdfs/Botulism-Proc02.pdf>



FATTORI PREDISPONENTI

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



Alcuni focolai diagnosticati

Nell'estate-autunno del **2008** 3 focolai (di tipo C) nella Regione Lazio, in particolare lago 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.



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 e nei potenziali "carrier" (pesci, molluschi ecc.) che possano sostituire il mouse test.



Caratterizzazione delle zone

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, nei pressi del Lago si trovava la 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 da sorgenti profonde.



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 sovra sfruttamento 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.





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 km² 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 km². 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 di 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 m³/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 ²)	Altitudine media (m s.l.m.,)	Profondità massima (m)	Volume (m ³ 10 ⁶)	Tempo di ricambio (anni)	Superficie (SB) (km ²)	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 km³ 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.



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 conseguenze 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. 1).





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



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



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	Camaiole	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

Per quanto concerne i parametri chimico fisici dell'acqua superficiale, rilevati durante i sopralluoghi sul lago Albano e sul 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 Albano era inoltre interessato da un evidente abbassamento del livello dell'acqua.





Tabella.4 – 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



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.

