

ZONOSI

Primi episodi di botulismo infettivo dei puledri in Italia: casi clinici

Valentina Liguori¹, Paolo De Iuliis¹, Magali Di Biasi², Lorenzo Selva², Paolo Aureli³, Lucia Fenicia³, Fabrizio Annibaldi³

¹ UnireLab, Pomezia, Roma

² Liberi professionisti

³ Centro Nazionale per il botulismo, Centro Nazionale per la qualità e i rischi alimentari, ISS, Roma

L botulismo è una rara e grave malattia neuroparalitica, che colpisce l'uomo e una ampia varietà di animali domestici e selvatici, causata dalla esposizione accidentale o volontaria a 7 differenti neurotossine (tossine tipo A-G). La malattia è caratterizzata dalla paralisi simmetrica dei nervi cranici e può essere seguita dalla paralisi flaccida, simmetrica e discendente, della muscolatura volontaria, che può provocare la morte del soggetto colpito per arresto respiratorio o cardiaco.

Tra gli animali colpiti dal botulismo, i cavalli sono sempre più frequentemente affetti da questa malattia come riportato dai veterinari dell'Unione europea [1-12, 27] e di altri Paesi quali Australia [13, 14], Israele [15], Senegal [16], USA [17-25] e Canada [26].

Il botulismo equino si presenta sotto tre diverse forme, tutte accidentali, diversamente da quello umano dove ne sono state riconosciute 6 distinte [28]: 1. la classica intossicazione botulinica che segue all'ingestione di tossina preformata, prodotta dalla crescita del *Clostridium botulinum* nei vegetali in decomposizione, nei foraggi o nelle carcasse; 2. la forma tossinfettiva intestinale e 3. il botulismo da ferita, dove entrambe le forme si manifestano a seguito della moltiplicazione del *C. botulinum in situ*. In particolare, mentre il botulismo da foraggi o da carcasse si può verificare rispettivamente quando nei vegetali si presenta un insieme di fattori, pH > 4.5, l'umidità e l'ambiente anaerobio, favorevoli alla moltiplicazione del *C. botulinum* o quando la carcassa dell'animale morto è invasa dal *C. botulinum*, generalmente il tipo C e D, che produce la tossina, le forme infettive si manifestano a seguito dell'assorbimento della neurotossina botulinica prodotta *in*

vivo quando le spore dei clostridi neurotossigeni infettano una ferita da trauma o chirurgica o colonizzano l'intestino dell'animale, germinano e si moltiplicano.

Fino ad oggi, nei cavalli sono state segnalate sia la forma classica, in assoluto la prevalente, indicata dagli autori anglosassoni come *forage poisoning*, sia le due suddette forme infettive [6, 17, 23, 24]; mentre nei puledri sono state riconosciute la forma da ferita e la forma tossinfettiva a indicare quel quadro clinico definito in passato dagli autori anglosassoni come *shaker foal syndrome*.

In ogni caso, qualunque sia la forma della malattia, la maggior parte degli AA ritiene che il botulismo sia essenzialmente lo stesso cioè una malattia caratterizzata da debolezza neuromuscolare progressiva che può evolvere a paralisi a seguito del blocco delle sinapsi colinergiche a livello delle giunzioni neuromuscolari per il mancato rilascio del mediatore chimico che presiede alla propagazione dell'impulso nervoso: l'acetilcolina. La malattia porta a morte l'animale colpito entro 24-72 ore dall'inizio dei segni clinici, per paralisi respiratoria, a meno che non sia assicurata la respirazione assistita e/o la tempestiva somministrazione dell'antisiero unitamente ad alimentazione forzata e/o parenterale diretta a mantenere l'idratazione.

Nei mammiferi, negli uccelli e nei pesci, la malattia è stata provocata dalle neurotossine prodotte da 4 batteri anaerobi sporigeni Gram positivi tossigeni del genere *Clostridium*, (precisamente il classico *C. botulinum* che produce le tossine tipo A, B, C, D, E e F, il *C. argentinense* che produce la tossina tipo G e due rari ceppi di *C. butyricum* e *C. baratii* che producono tossine similbotuliniche tipo E ed F), mentre nei



cavalli la malattia è stata provocata fino ad oggi dalle neurotossine prodotte dal *C. botulinum* tipo A, B, C e D.

Casi di botulismo animale sono stati segnalati in Italia; tuttavia, la mancanza di una raccolta sistematica degli stessi, dato il mancato obbligo della notifica prevista invece nel caso in cui la malattia colpisca l'uomo, non consente di indicare quali specie siano soprattutto colpite né quale sia la forma prevalente. Alcuni di noi però sono stati coinvolti nelle indagini associate a casi di botulismo aviario (fagiani, coturnici, germani reali, anatre mute) e botulismo bovino (vacche da latte).

In questa nota riportiamo due casi di botulismo nel cavallo che, a nostra conoscenza, sono i primi casi segnalati in Italia. Ciò che rende particolari tali casi non è solo il fatto che si tratta di forme infettive distinte, la tossinfezione intestinale e la forma da ferita, quanto il fatto che quest'ultima è probabilmente stata provocata dalla infezione da parte delle spore del *C. botulinum* delle lesioni ulcerose dello stomaco.

Caso clinico n. 1

In una azienda, che da molti anni alleva cavalli di razza Avelignese e incroci destinati sia all'impiego ludico sia al consumo alimentare, negli ultimi tre anni 11 soggetti giovani di età compresa tra i 3 e i 7 mesi sono deceduti 3-5 giorni dopo la comparsa dei seguenti segni clinici: inappetenza, debolezza, incoordinazione degli arti posteriori, tremori e fascicolazioni dei muscoli della spalla, scialorrea, difficoltà nella prensione del cibo e nella deglutizione, respirazione affannosa. L'azienda, che insiste su 15 ettari di terreno, ove il branco si spostava consentendo la rotazione dei pascoli, è sita a sud di Roma in un'area a diffusa vocazione agricola con rari insediamenti abitativi. L'allevamento si compone di un numero variabile di soggetti (tra i 5 e i 15) di varie età, alimentati, nel caso dei puledri, con latte materno ed erba al pascolo integrata esclusivamente con foraggio di buona qualità proveniente da un'azienda vicina; l'acqua è quella potabile in dotazione alla casa padronale, fornita agli animali in apposite vasche, riempite quotidianamente; esiste, tuttavia, nel terreno un piccolo corso d'acqua in un'area piuttosto scoscesa, difficilmente accessibile ai cavalli. Nell'azienda non vengono allevate altre specie animali; tuttavia, per un certo periodo di tempo la proprietà ha consentito lo scarico di pollina (letame proveniente da un allevamento avicolo) sotto un uliveto all'interno della proprietà al quale i cavalli non hanno mai avuto accesso diretto.

Il giorno 2 novembre 2006 il laboratorio dell'Unirelab di Pomezia, centro di riferimento diagnostica dell'UNIRE, viene contattato da due veterinari ippisti perché una giovane puledra di 5 mesi presentava difficoltà di deglutizione, paralisi e prolasso della lingua, tremori e fascicolazioni della spalla, depressione, andatura irregolare e, infine, difficoltà respiratorie e decubito. Alla visita la puledra mostra di essere in grado di stare in piedi, tenta di bere dagli abbeveratoi ma non riesce a deglutire e mostra un evidente prolasso della lingua e una

riduzione generalizzata del tono muscolare mentre la muscolatura del collo appare contratta. L'animale è, comunque, vigile e cosciente. Sulla base dei segni clinici riscontrati viene ipotizzata la diagnosi di sospetto botulismo. L'animale viene spontaneamente a morte nella notte e viene tempestivamente trasportato nei laboratori dell'Unire per l'esame necroscopico. Un completo esame *post mortem* viene effettuato 12 ore dopo il decesso e l'esame istologico di una selezione di organi tra cui il fegato, cuore, polmone, rene, milza, muscolatura scheletrica, piccolo e grande intestino, cervello e midollo non evidenzia significative lesioni fatta eccezione di una estesa e grave infestazione da *Gasterophilus* spp e Ascaridi nello stomaco; inoltre, l'intestino tenue risulta quasi privo di contenuto alimentare, mentre le feci nel grosso intestino risultano secche e a tratti ricoperte di muco. La diagnosi differenziale ha considerato le seguenti malattie oltre il botulismo: il tetano, la rabbia, le forme neurologiche dovute a encefalomieliti virali (*herpes - west nile*) o encefalomieliti batteriche (*Streptococcus - Listeria monocytogenes*), l'encefalopatie congenite, la setticemia, l'avvelenamento (carbammati, organofosforici, metalli pesanti). Gli esami effettuati nel Laboratorio Unire hanno consentito di escludere tutte le suddette ipotesi a eccezione del botulismo per il quale è stata chiesta la collaborazione dell'Istituto Superiore di Sanità al quale sono stati inviati campioni biologici per la ricerca delle tossine e delle spore dei clostridi neurotossici ai fini della conferma del sospetto diagnostico.

Caso clinico n. 2

Il secondo soggetto è invece un puledro PSI, (galoppatore) nato e custodito assieme alla madre presso una stazione di monta in provincia di Viterbo dove le condizioni igienico-sanitarie si mantengono su buoni livelli. Il puledro, nato sano e vitale, manifesta dopo 50 giorni dalla nascita, difficoltà di deglutizione e decubito improvviso. Il soggetto viene inviato per l'esame clinico e l'istituzione di terapie intensive, presso una vicina clinica ove vengono riscontrati decubito, incapacità ad alzarsi, incapacità a deglutire, pur in presenza dello stimolo della suzione; risultavano nella norma il respiro, la frequenza cardiaca respiratoria, la temperatura e i valori ematici; il soggetto era comunque vigile e cosciente. Si sospettano un caso di botulismo o di encefalite virale o trauma spinale. Dato il decubito persistente, la proprietà decide per la soppressione farmacologica e richiede a Unirelab l'esame necroscopico.

Alla necropsia effettuata poche ore dopo l'eutanasia non si osserva alcun tipo di manifestazione a carico di milza, linfonodi e timo; tuttavia, il puledro risulta setticemico per la presenza di *E. coli* nel polmone e nelle articolazioni e per un'infezione cronica da *Rhodococcus equi* nel polmone; fatto questo che, assieme all'assenza di febbre e di alterazione dei parametri clinici, ha portato a sospettare un caso di agammaglobulinemia. A livello gastroenterico non si sono osservati parassiti; tuttavia, il puledro presenta profonde ulcerazioni. Anche in questo caso

campioni biologici vengono inviati all'Istituto Superiore di Sanità per la ricerca di spore e della tossina botulinica.

Ricerca della tossina botulinica e delle spore

I reperti autoptici (ileo, colon, tessuto gastrico ulcerato e il contenuto del cieco e del colon) arrivati refrigerati all'ISS sono stati omogenati opportunamente con il tampone fosfato-gelatina sterile e mantenuti refrigerati per alcune ore per consentire l'eluizione della tossina. Gli omogeneizzati dei tessuti e delle feci sono stati altresì colturali per la ricerca delle spore. Le procedure analitiche adottate per la ricerca della tossina sono state quelle tradizionale di tossicità e neutralizzazione nel topino, mentre per le spore si è proceduto alla coltivazione dei campioni in terreni colturali e successivo test biologico su topini, accoppiata alla ricerca del batterio con metodi molecolari per una rapida identificazione del sierotipo, tutte descritte in precedenti lavori [29-31]. I ceppi isolati sono stati subtipizzati mediante PFGE secondo Nevas *et al* [32].

Una volta confermati i sospetti diagnostici clinici si è proceduto a un successivo prelievo e esame di materiale residui delle vasche utilizzate come abbeveratoi, e di terriccio proveniente dalle zone in cui i puledri hanno vissuto e delle feci delle madri. I campioni ambientali sono stati esaminati come descritto in precedenza [31].

Risultati e discussione

Nel contenuto intestinale della puledra di 5 mesi e nei tessuti ulcerati del puledro di 40 giorni sono state ritrovate le spore del *C. botulinum* tipo B ma non la tossina. Il ritrovamento delle spore del *C. botulinum* nel tratto gastrointestinale di un animale con i segni clinici del botulismo è considerato elemento sufficiente per la conferma del sospetto clinico [25]. Il fatto di aver trovato le spore nello stomaco di uno dei due puledri affetto da ulcere gastriche fa sospettare che l'animale possa ragionevolmente essere stato vittima di un caso di botulismo da ferita tanto più che né nelle feci né nei tessuti dell'intestino sono state rilevate tossine. Nell'altro soggetto la mancanza di lesioni lungo il canale digerente fa ragionevolmente sostenere il fatto che possa essersi trattato di un caso di tossinfezione botulinica. È ben vero che non sono disponibili dati sulla presenza del *C. botulinum* nelle feci dei puledri mentre le spore del *C. botulinum* sono state trovate nelle feci di bovini, suini, volatili. Tuttavia, è stato riportato che le spore di clostridi neurotossigeni raramente sono state isolate da cavalli normali sani che non erano a rischio di botulismo e quindi non sono un componente della flora intestinale di tali animali. Pertanto, è verosimile il fatto che i puledri possano aver ingerito le spore del *C. botulinum* con qualunque fonte ambientale e in condizioni adatte, rispettivamente l'anaerobiosi delle ulcere con tessuto necrotico e la mancanza di un competitore microbico intestinale possano aver facilitato l'infezione e quindi la comparsa della malattia. Il mancato ritrovamento della tossina botulinica in entrambi i casi non deve sorprendere data la

maggiore riconosciuta sensibilità del cavallo alla tossina botulinica rispetto ai topolini utilizzati nei test di laboratorio. Swerczech [17] ha, infatti, dimostrato che la somministrazione per via *e/v* a un cavallo adulto di una certa quantità di tossina botulinica provocava la caratteristica sindrome, mentre quando la stessa qualità veniva inoculata per via intraperitoneale in una cavia non ne provocava la morte. Non si può tuttavia escludere il fatto che almeno in un caso (la forma tossinfettiva) il mancato riscontro della tossina possa essere dovuto anche alla degradazione a opera degli enzimi proteolitici intestinali. È da ricordare il fatto che le particolari condizioni di acidità dello stomaco di un soggetto normale sano non consentono la germinazione e la moltiplicazione delle spore. È infatti noto che valori di pH inferiori a 4,6 sono assolutamente inibenti tali eventualità. Solo quindi la particolare situazione patologica derivante dalle ulcerazioni dell'epitelio gastrico può aver creato le condizioni favorevoli per la colonizzazione e germinazione delle spore botuliniche e successiva produzione di tossina.

In precedenza, solo 4 casi di botulismo da ferita nei cavalli sono già stati segnalati, due nell'animale adulto dovuti a trauma (ascesso da iniezione) o ad atto chirurgico (castrazione) e due nel puledro conseguenti all'onfaloflebite. Secondo taluni AA [17] diete iperproteiche e/o iperlipidiche nelle fattrici possono aumentare il tasso di corticosteroidi nel latte che a loro volta sarebbero la causa della formazione di ulcere nell'apparato gastrointestinale nei giovani soggetti; anche diete eccessivamente ricche in proteine, come si verifica per il consumo al pascolo di leguminose, porterebbe alla comparsa di simili manifestazioni.

Alcuni soggetti possono manifestare segni clinici di lieve entità e recuperare entro qualche giorno solo con una terapia di supporto anche se qualche muscolo richiede alcuni mesi per il completo ripristino del tono.

I risultati del test di subtipizzazione molecolare con PFGE indicano che i 3 ceppi produttori della stesso tipo di tossina (ceppo isolato dall'ileo del caso n.1, ceppo isolato dall'ulcera gastrica del caso n. 2 e ceppo isolato dal terreno di una delle due fattorie) sono cloni di uno stesso ceppo. Questo fatto è da mettere in relazione alla prevalente presenza ambientale del sierotipo B rispetto ai tipi A, C, D, E, F riscontrata dal Centro Nazionale per il botulismo nel nostro Paese (dati non pubblicati).

Considerando che in Italia non è disponibile il siero antitossinico per la terapia dei cavalli, né è in uso la vaccinazione degli animali, si ritiene opportuno che quei soggetti che manifestino i segni clinici del botulismo siano confinati nel più breve tempo possibile nella stalla in modo da ridurre l'attività fisica al minimo (l'attività muscolare, infatti provoca, il consumo delle riserve di acetilcolina con la conseguenza di accelerare l'indebolimento dell'animale e portarlo a morte), sottoposti a terapia di sostegno (fleboclisi) e, laddove disponibile, a ventilazione forzata negli stadi avanzati della patologia. Se le condizioni tendono comunque a peggiorare, può rendersi necessaria l'eutanasia.

La bibliografia è disponibile presso la redazione:
argomenti@sivemp.it