

Società Italiana di Buiatria  
Giornata Buiatrica  
Legnaro (PD) 28.10.2008



# Le clostridiosi nel bovino da carne: diagnosi e controllo

*Carlo Rosignoli*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

*Sezione di Mantova*



# Genere *Clostridium*

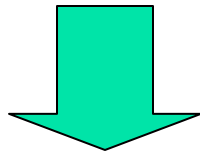
---

- *Bacilli Gram positivi*
- *Anaerobi*
- *Sporigeni*
  
- **Partecipano ai processi di degradazione della sostanza organica:**
  - *fermentazione*
  - *putrefazione*
  - *ecc.*



# Clostridi: germi ubiquitari

- *Suolo - acque sup.- app. digerente*
- *(anche se la distribuzione **non è uniforme** per le diverse specie)*



- **1) impossibile eliminare l'esposizione**
- **2) importanza delle “condizioni predisponenti” o dei “fattori di rischio” per l'insorgenza di molte patologie**





# Clostridi e patogenicità

Più di 140 specie di cui circa 40 sono considerate patogene

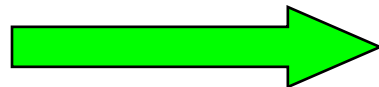
## Patogeni minori

27 specie

## Patogeni maggiori:

13

specie

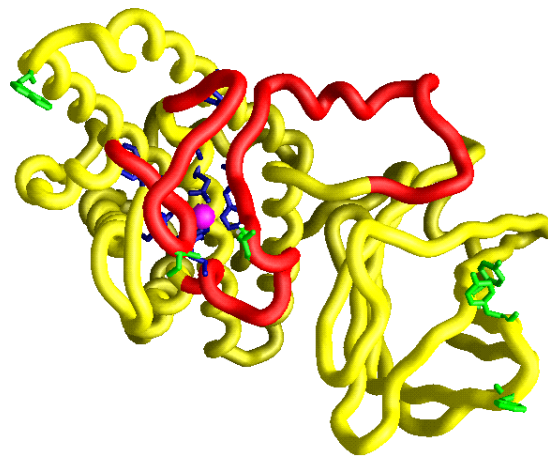


<i>C. botulinum</i>	<i>C. novyi</i>
<i>C. chauvoei</i>	<i>C. perfringens</i>
<i>C. colinum</i>	<i>C. piliforme</i>
<i>C. difficile</i>	<i>C. septicum</i>
<i>C. haemolyticum</i>	<i>C. sordellii</i>
<i>C. histolyticum</i>	<i>C. spiroforme</i>
	<i>C. tetani</i>



Le clostridiosi sono delle  
"sindromi tossiche"  
acute / iper-acute

tossine = proteine = antigeni





<b>Specie</b>	<b>Tossine</b>	<b>Attività</b>
<b>C. botulinum</b>	<b>Neurotossina C2 C3</b>	<b>Letale Permeasi ADP- ribosilazione</b>
<b>C. tetani</b>	<b>Neurotossina Tetanolisina</b>	<b>Letale Emolisina</b>
<b>C. perfringens</b>	<b>Alpha Beta1 Beta2 Epsilon Iota Enterotossina Delta Theta Kappa Lambda Mu Nu Neuraminidasi</b>	<b>Fosfolipasi/citotossica Letale/necrotica Letale/necrotica Letale/permeasi/necrotica ADP ribosilazione Intossicazione alimentare Emolisina Emolisina Collagenasi Proteasi Ialuronidasi DNasi Neuraminidasi</b>
<b>C. difficile</b>	<b>Tossina A Tossina B CDT</b>	<b>Enterotossina/citotossica/letale Citotossica/letale ADP-ribosilazione</b>
<b>C. sordellii</b>	<b>Alpha HT LT Emolisina</b>	<b>Fosfolipasi C Letale/necrotica Letale/ citotossica/necrotica Emolisina ossigeno-labile</b>
<b>C. haemolyticum / C. novyi</b>	<b>Alpha Beta Gamma Delta Epsilon</b>	<b>Letale Fosfolipasi C Fosfolipasi C Emolisina Lipasi</b>
<b>C. chauvoei/ C. septicum</b>	<b>Alpha Beta Gamma Delta</b>	<b>Letale, necrotica DNasi Ialuronidasi Emolisina</b>

Principali tossine prodotte da clostridi potenzialmente patogeni per il bovino

(Popoff 1989, Hatheway 1990, Petit 1999, Songer 2002).



# Clostridi e clostridiosi nel bovino

## CLOSTRIDI NEUROTOSSICI

*C. botulinum*  
*C. tetani*

**BOTULISMO**

**TETANO**

## CLOSTRIDI ISTOTOSSICI

*C. septicum*  
*C. chauvoei*  
*C. novyi*  
*C. sordellii*  
*C. perfringens*  
*C. haemolyticum*

**GANGRENE o**

**Infezioni dei tessuti**

**muscoli**

**sottocute e fasce**

**fegato**

**abomaso**

## CLOSTRIDI ENTEROTOSSICI

*C. perfringens*  
*C. sordellii*

**ENTEROTOSSIEMIE**

*C. difficile* ???

**ENTEROCOLITE**

# Clostridiosi nel bovino da carne: le sindromi più importanti



Morte improvvisa



Infezioni dei tessuti  
(gangrene)



Enterotossiemie

Focolai di paralisi muscolari  
da tossina botulinica



Episodi rari ma con elevate  
perdite economiche  
Scarsa percezione del rischio



## Domanda a 15 Veterinari di bovini da carne

Che posto occupa, come importanza, la  
"morte improvvisa" nell'allevamento del  
vitellone da ristallo?

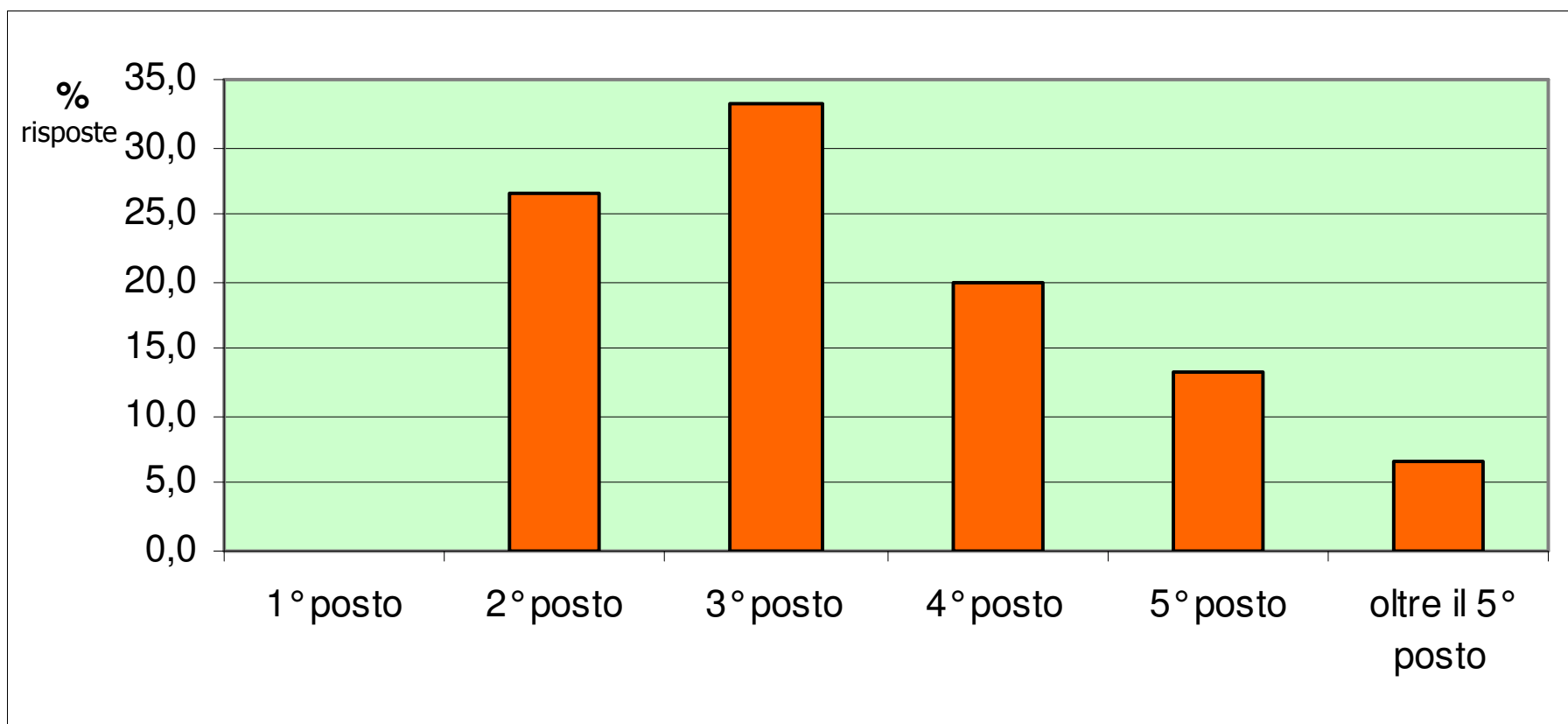
Importanza

=

Danno economico

X

Frequenza





# Sindrome della "Morte improvvisa"

①

NON CLOSTRIDIOSI

②

CLOSTRIDIOSI

**Importanza della  
diagnosi differenziale**

# Possibili cause di morte in 24 ore nel bovino

- Acidose suraiguë du rumen (excès de glucides ou excès d'acides gras volatils)
- Anaphylaxie (quelques cas)
- Anaplasmose suraiguë
- Anémie hémolytique du nouveau-né (réaction immunitaire suite à l'ingestion d'un colostrum riche en anticorps anti-érythrocytaires)
- Anoxie cérébrale (aiguë)
- Atteinte cardiaque (aiguë)
- Botulisme (forme suraiguë)
- Carence en cuivre (rare)
- Carence suraiguë en sélénium/vitamine E (syndrome myopathie/dyspnée)
- Charbon symptomatique
- Choc
- Coup de chaleur
- Electrocutation
- Emphysème des regains
- Endocardite
- Entérotoxémies (*Clostridium perfringens* types A, B, D, E)
- Fluorose aiguë
- Foudroiement
- Haemonchose
- Hémoglobinurie bacillaire
- Hémophilose (*Haemophilus somnus*)
- Hyperthermie
- Hypocalcémie post-partum
- Hypocalcémie liée à un stress thermique (froid) pendant un transport et un jeûne de longue durée
- Hypomagnésiémie
- Hypothermie
- Intoxication aiguë par l'arsenic
- Intoxication par l'azote non protéique
- Intoxication par le cuivre
- Intoxication par le mercure
- Intoxication par les organophosphorés
- Intoxication par le phosphore
- Intoxication aiguë par le sel
- Intoxication par la strychnine
- Intoxication par le tétrachlorure de carbone
- Intoxication par l'iif
- Intoxication par le cyanure
- Leucose bovine enzootique (quelques cas)
- Listériose (forme septicémique néo-natale)
- Maladie d'Aujeszký
- Mammites (coliformes : *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*)
- Mammites (*Actinomyces (Corynebacterium) pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*)
- Mammite staphylococcique suraiguë
- Météorisation ruminale (gazeuse ou spumeuse)
- Métrites
- Pasteurellose pulmonaire
- Rhinotrachéite infectieuse bovine (lors de complications de bronchiolite obstructive)
- Rupture de la vésicule (avec hémorragie)
- Saturnisme aigu
- Septicémie néo-natale
- Syndrome hémorragique sévère
- Thrombose de la veine cave postérieure (quelques cas)
- Ulcération de l'abomasum (associée à une hémorragie sévère)

54 cause

Brugere-Picoux (1999)  
Bull. Soc. Vet. Prat. de France



# Sindrome della "Morte improvvisa"

① NON CLOSTRIDIOSI

② CLOSTRIDIOSI

**Gangrene**  
(infezione dei tessuti)

**Enterotossemie**

esogene

endogene



# Gangrene esogene

le ferite cutanee come  
via di entrata

Ferite accidentali

Iniezioni

***C. septicum***

*C. sordellii*

*C. novyi*

*C. perfringens*

*C. chauvoei*

Lesioni podali

Ferite chirurgiche



# EDEMA MALIGNO

---

- *Coinvolgimento del sottocute e dei piani delle fasce muscolari:*
  - *rigonfiamento “soffice”*
  - *edema gelatinoso, spesso emorragico*
  - *nella forma classica è rara la presenza di bolle di gas*



# Le gangrene endogene

Ipotesi: lesioni o soluzioni di continuo a livello della mucosa dell'apparato digerente ...

Carb. sintomatico classico

Carb. sintomatico  
viscerale

Abomasite necrotica

Emoglob. bacillare

Paracarbonchio sint.

spore

spore

spore

spore

spore

... diffusione delle  
spore ai tessuti -  
latenza - anossia -  
germinazione -  
tossinogenesi -  
patologia.

# Carbonchio sintomatico **classico**: lesioni muscolari (Blackleg)

- ***Clostridium chauvoei***
- *Lesione muscolare di varie dimensioni da molto piccola a molto estesa*
- *Area centrale da **rosso scuro a nera, asciutta con piccole bolle di gas (crepitante)***
- *Caratteristico odore di “**burro rancido**” (acido butirrico)*



# Carbonchio sintomatico **viscerale**

(Helman et al., 1997) (Uzal et al. 2003)

- ***Pericardite siero-fibrinosa***
- *Pleurite siero-fibrinosa*  
*Edema polmonare*
- *Versamenti cavitari*
  
- ***Aree a margini irregolari di colore scuro nel muscolo cardiaco*** (*ventricoli e atri*),





# Edema maligno dell'abomaso (Braxy)

---

- ***Abomasite necrotico-emorragica grave*** con *batteriemia e tossiemia fatale.*
- **C. septicum**  
**C. perfringens**





# EMOGLOBINURIA BACILLARE

---

- *Clostridium haemolyticum*
- ***Emoglobinuria***
- ***Infarto ischemico al fegato***  
(lesione patognomonica)
  - *circoscritto*
  - *leggermente rilevato*
  - *più chiaro del parenchima normale*
  - *in genere circondato da una zona bluastra di congestione*



# Paracarbonchio sintomatico (*C. sordellii* - *C. septicum* ...)

- *Lesioni nel sottocute e nelle fasce ma ...*
  - *senza la presenza di una ferita cutanea*
  - *spesso con gas*



# Sindrome della "Morte improvvisa"

① NON CLOSTRIDIOSI

② CLOSTRIDIOSI

**Gangrene**  
(infezione dei tessuti)

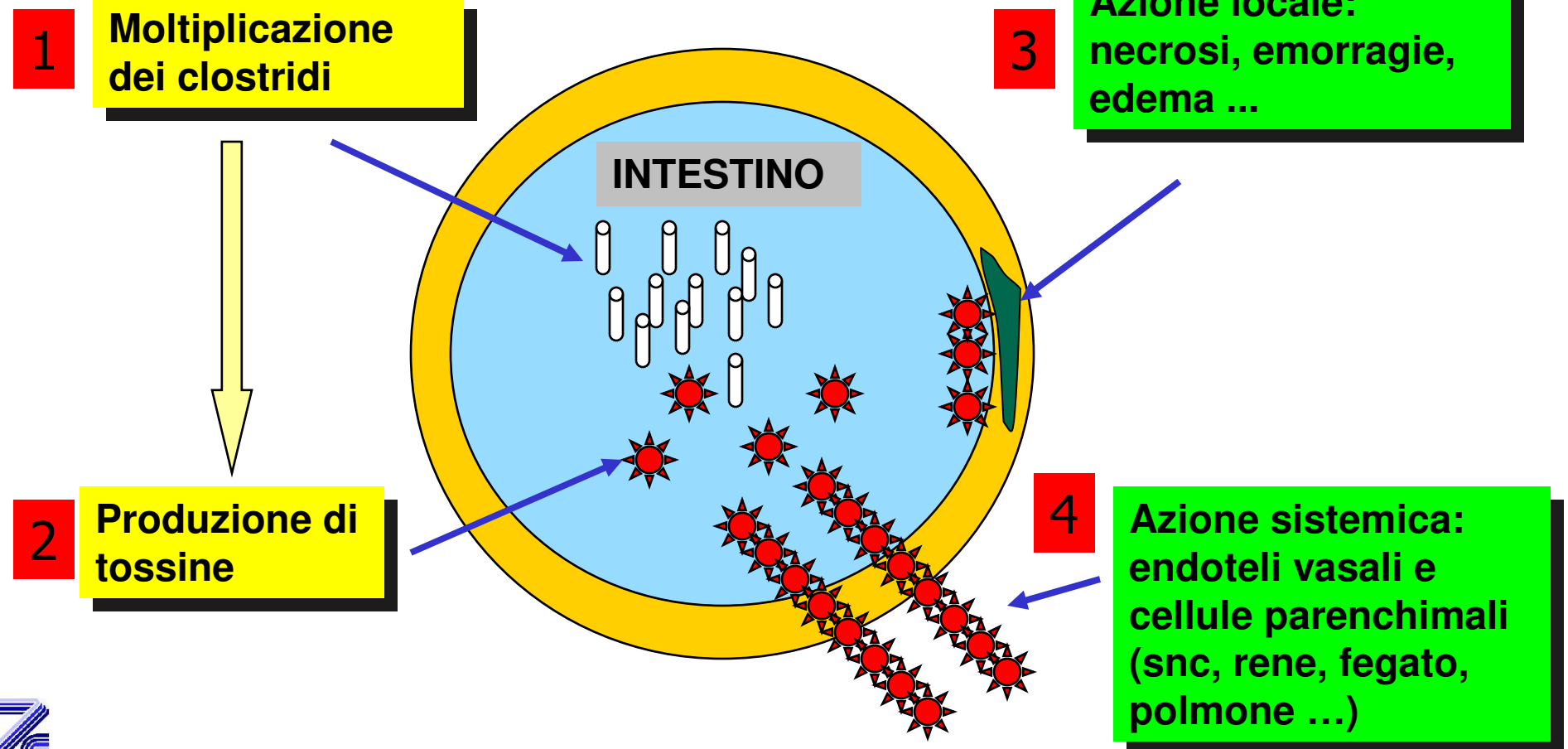
**Enterotossiemia**

Alterazione dell'equilibrio  
dell'ecosistema intestinale

**C. perfringens**  
**C. sordellii**



# Enterotossitemia: patogenesi





## Altre possibili lesioni

---

- *Versamenti cavitari*
- *Fegato: aree di degenerazione*
- *Edema polmonare*
- *Emorragie sulle sierose*
- *Emorragie nella mucosa tracheale*
- *Petecchie sub-epicardiche*





# Prelievo dei campioni

---

- *Tessuti: possibilmente il campione deve comprendere anche il tessuto sano che circonda la lesione*
- *Intestino: prelievi in più tratti del digiuno*
- *Versamenti cavitari*
- *Osso lungo (costola)*





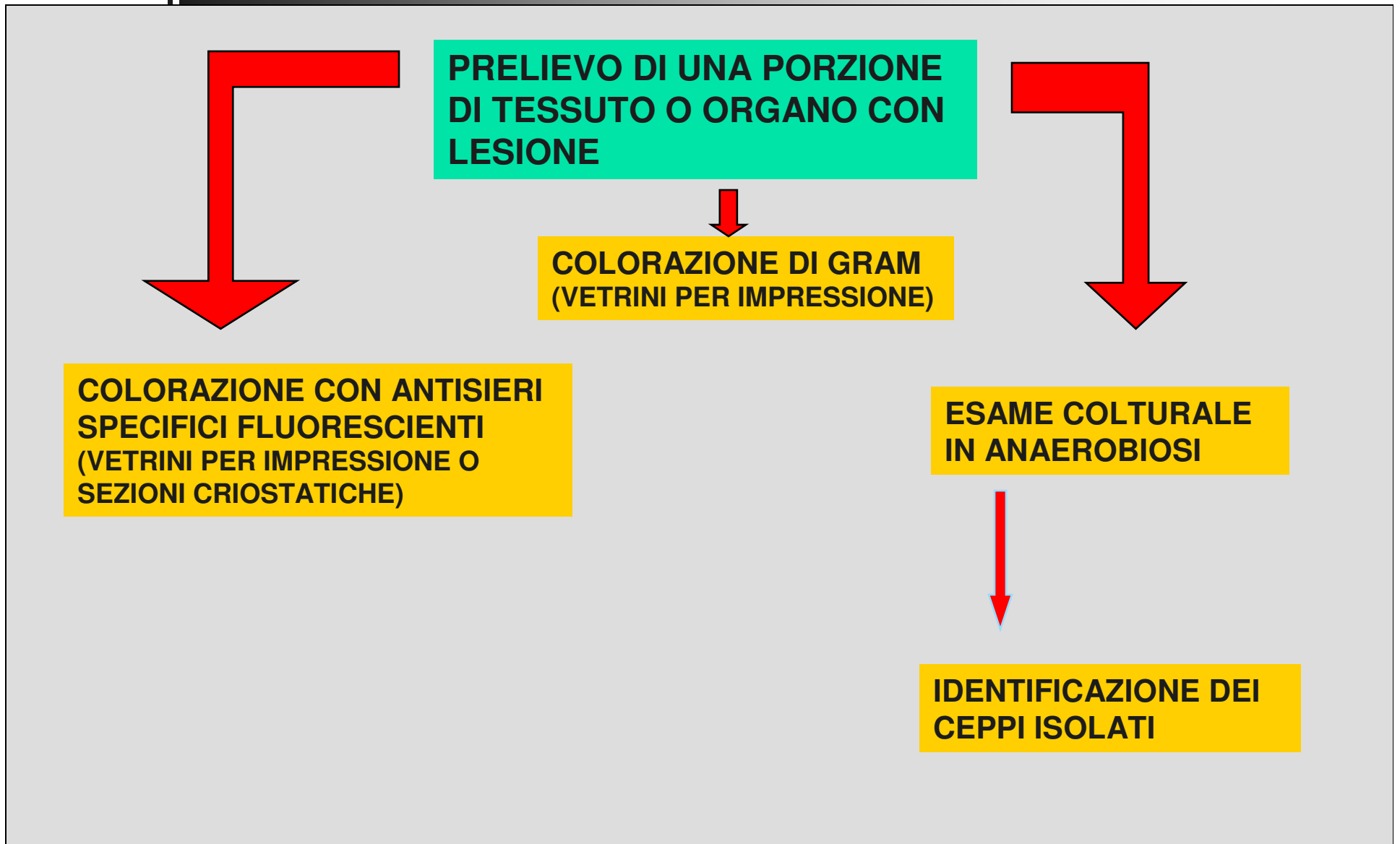
# Invio campioni

---

- **Contenitori:**
  - **a tenuta** per i liquidi (riempiti completamente)
  - **sacchetti** di plastica per visceri e organi (togliere l'aria residua prima della chiusura)
  
- **Temperatura durante il trasporto**
  - **refrigerazione** (es. microbiologici)
  - **congelamento** (es. tossicologici)
  - **ambiente** (tessuti fissati in formalina)



# FORME ISTOTOSSICHE: diagnosi di laboratorio



# ENTEROTOSSIEMIA: diagnosi di laboratorio

**CONTENUTO  
INTESTINALE**

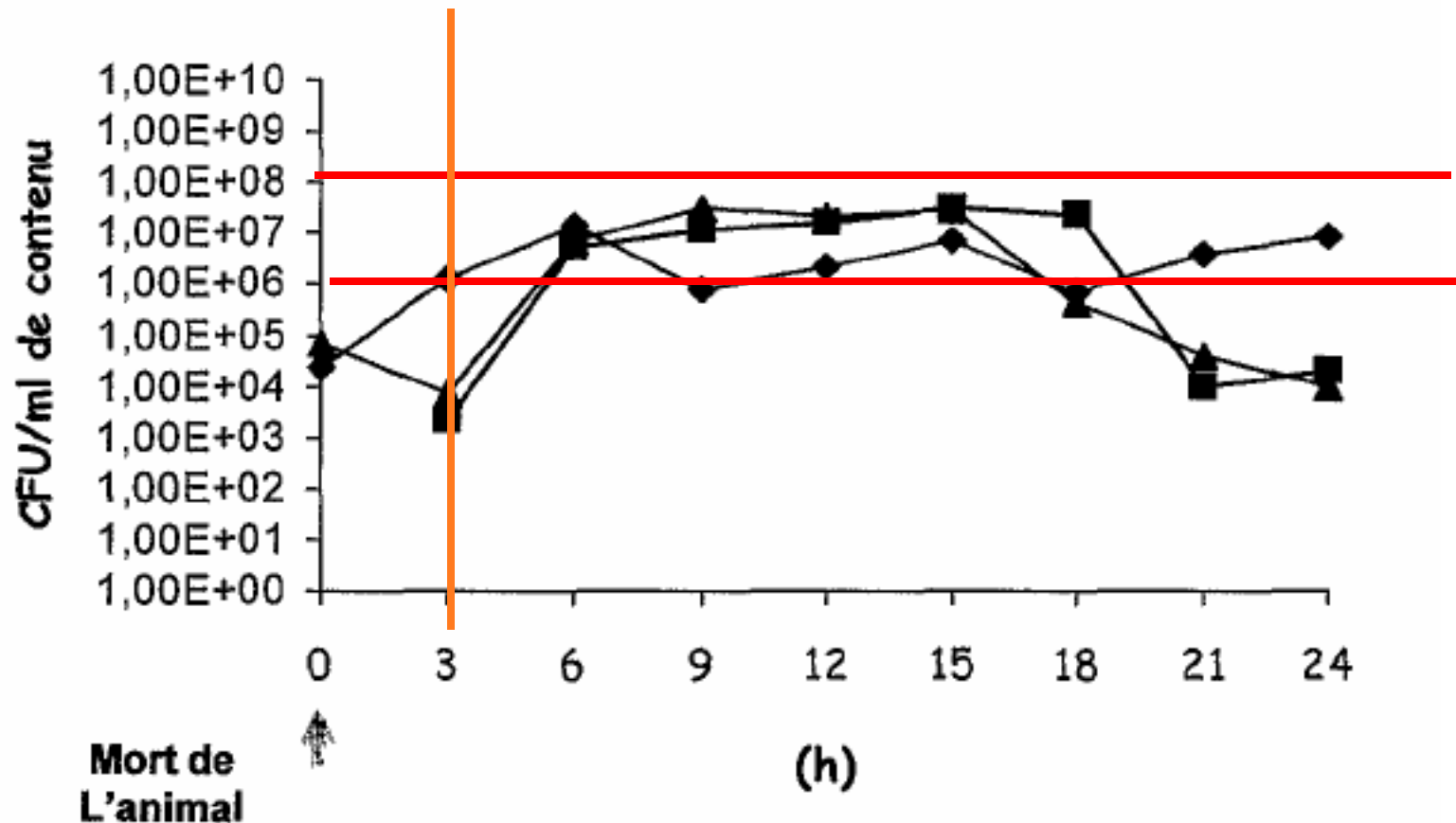
**COLTURA IN  
ANAEROBIOSI :  
Conteggio (diluizioni  
decimali)**

**RICERCA DELLE TOSSINE  
(anche da eventuali  
versamenti cavitari)**

**Clostridium perfringens:  
GENOTIPIZZAZIONE**



# Evoluzione post mortem della concentrazione di *C. perfringens* nell'intestino (Philippeau, 2003)



n.3 vitelloni normali - eutanasia - temperatura 18-20 °C



# Interpretazione della carica di *C. perfringens* nel contenuto intestinale

UFC / ml di contenuto intestinale	Tempo tra la morte e il prelievo			
	< 3 h	3 < t < 6 h	6 < t < 15 h	> 15 h
< 10 <sup>5</sup>	NO	NO	NO	Non interpretabile
10 <sup>5</sup> < n < 10 <sup>6</sup>	Dubbio	Dubbio	Dubbio	Non interpretabile
10 <sup>6</sup> < n < 10 <sup>7</sup>	SI	Dubbio	Dubbio	Non interpretabile
10 <sup>7</sup> < n < 10 <sup>8</sup>	SI	SI	Dubbio	Non interpretabile
> 10 <sup>8</sup>	SI	SI	SI	Non interpretabile

*Picard e coll. (2005)*

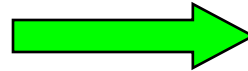




# Precisione nella diagnosi per una profilassi mirata

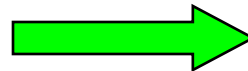


Forme istotossiche  
esogene



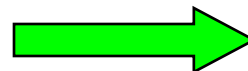
Ferite: lesioni accidentali,  
iniezioni con farmaci  
contaminati, lesioni podali  
...

Forma istotossiche  
endogene



Vaccinazione  
Lesioni app. digerente ???

Forme  
enterotossiche

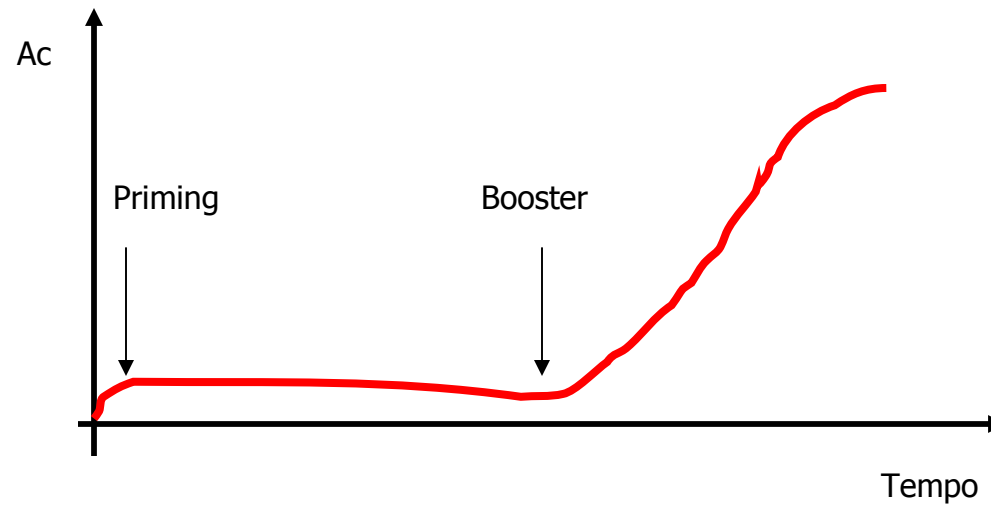
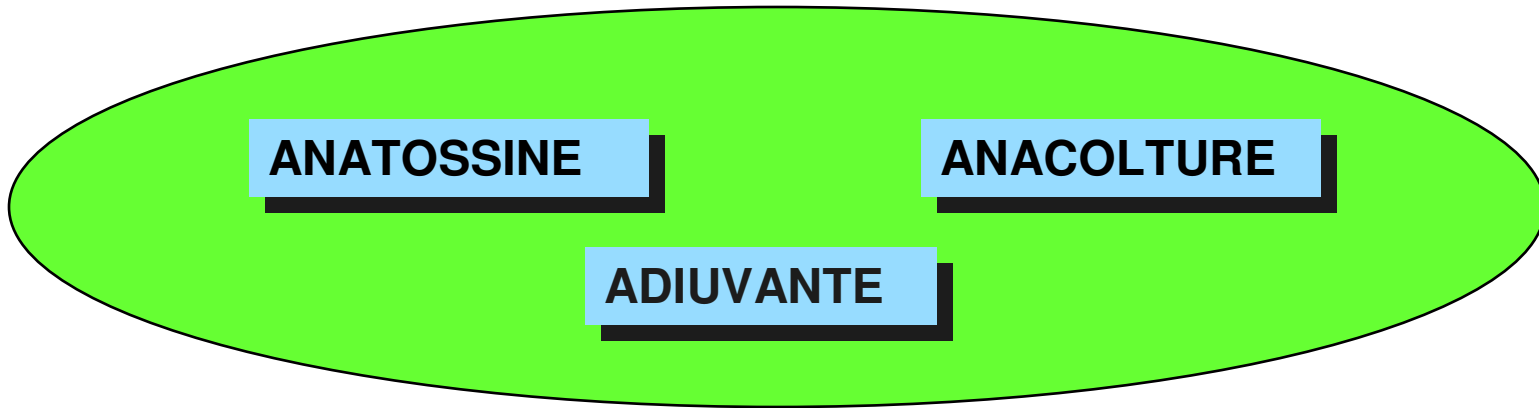


Fattori di rischio  
alimentari e gestionali ...  
Vaccinazione



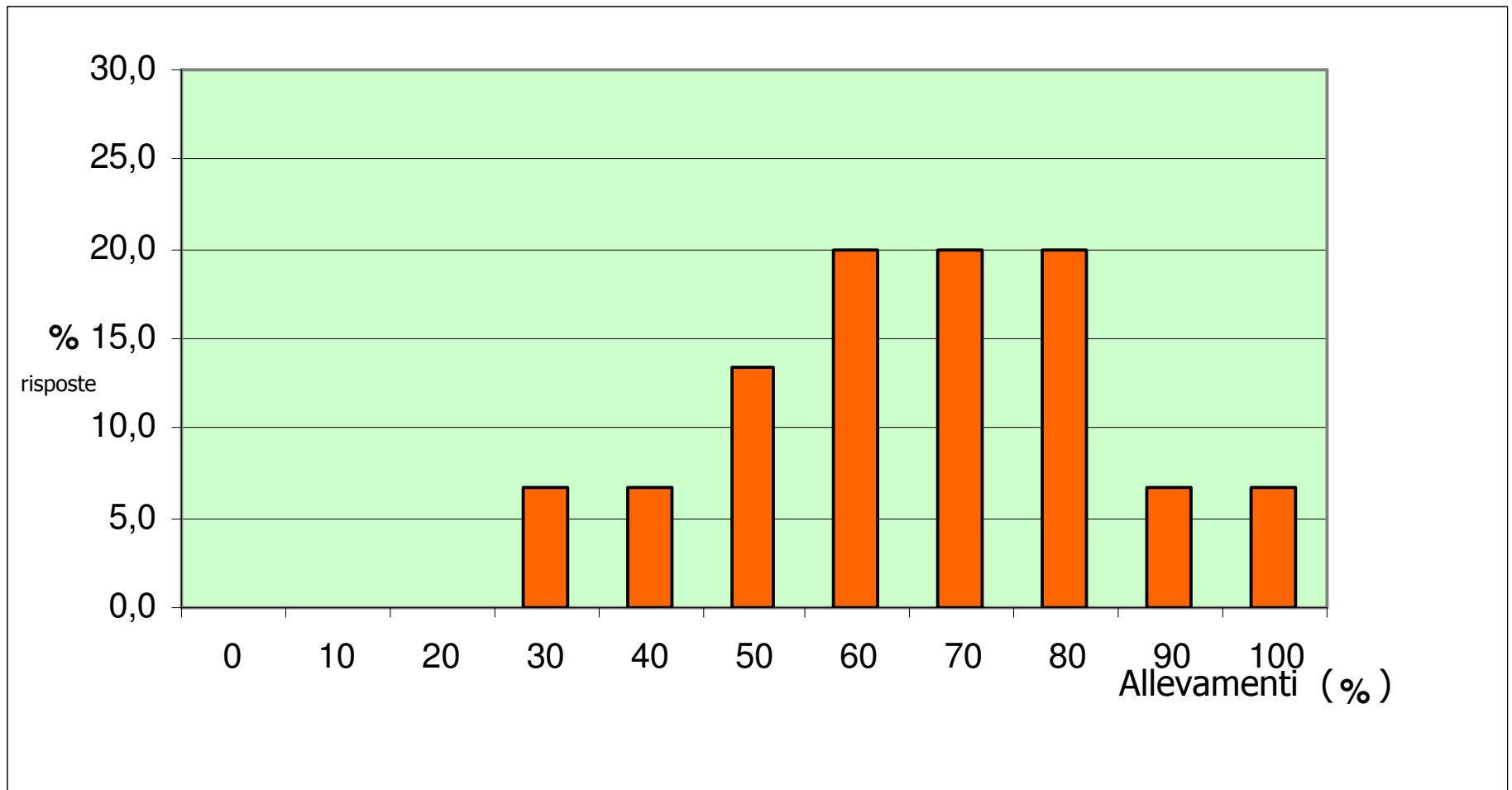


# Vaccini per clostridi



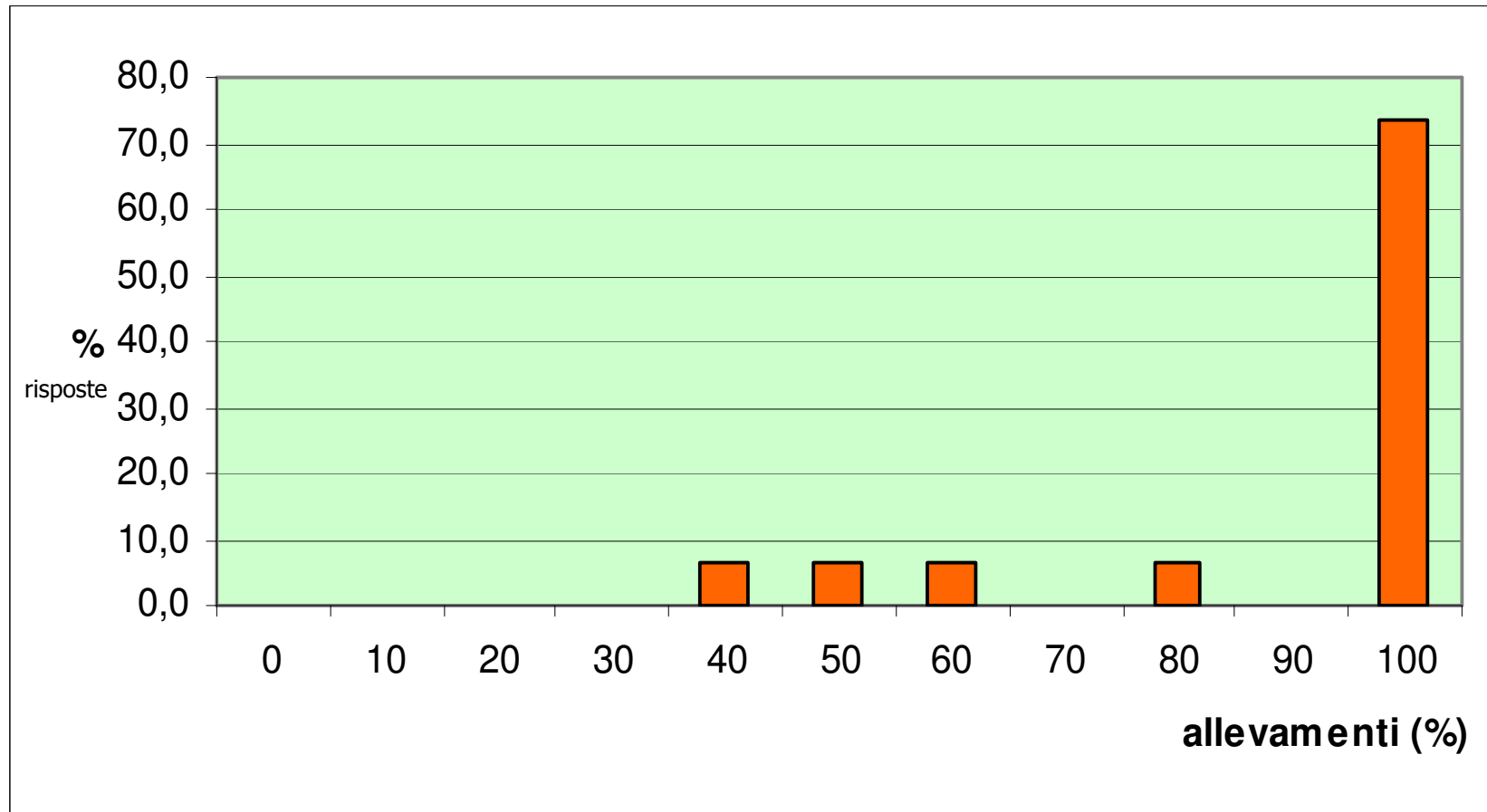
**Domanda a 15**  
**Veterinari di bovini**  
**da carne**

In quanti allevamenti utilizzi la  
vaccinazione per clostridi ?



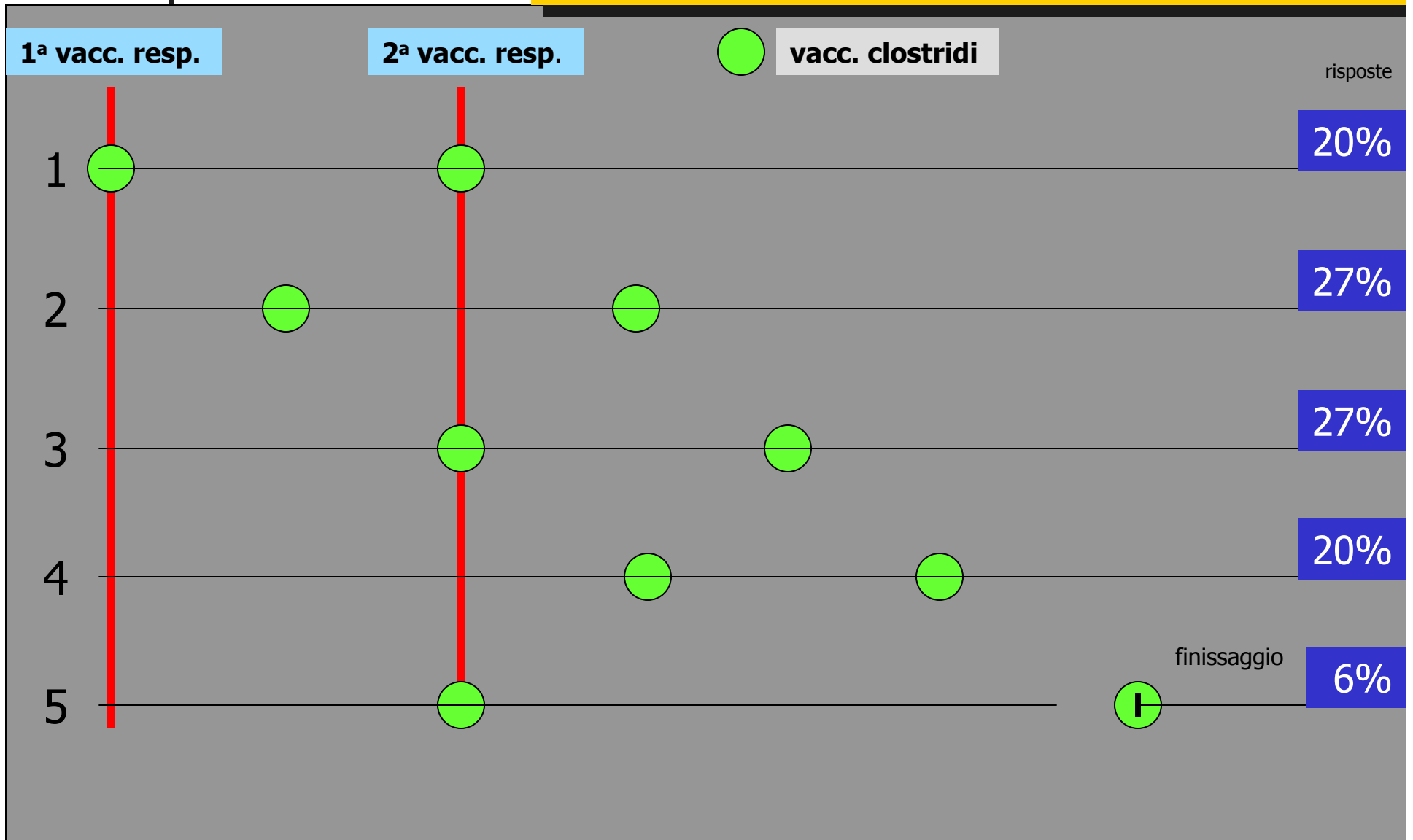
**Domanda a 15**  
**Veterinari di bovini**  
**da carne**

In quanti allevamenti esegui la doppia  
vaccinazione?



Domanda a 15  
Veterinari di bovini  
da carne

Dove posizioni gli interventi vaccinali ?  
5 protocolli



# Efficacia delle vaccinazioni: tre punti critici



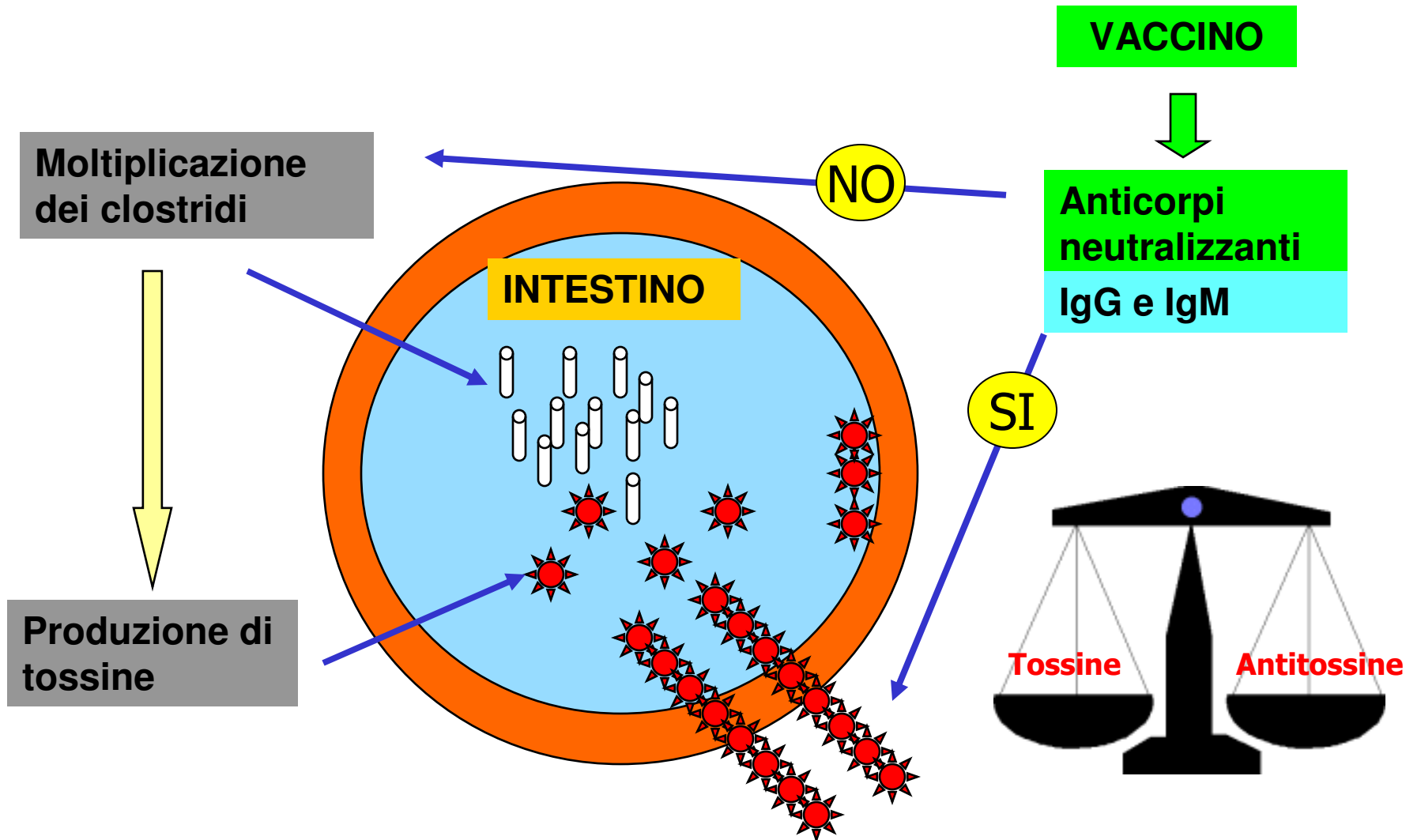
Controllo della temperatura  
del frigorifero

Igiene delle siringhe e degli aghi

Modalità di inoculo



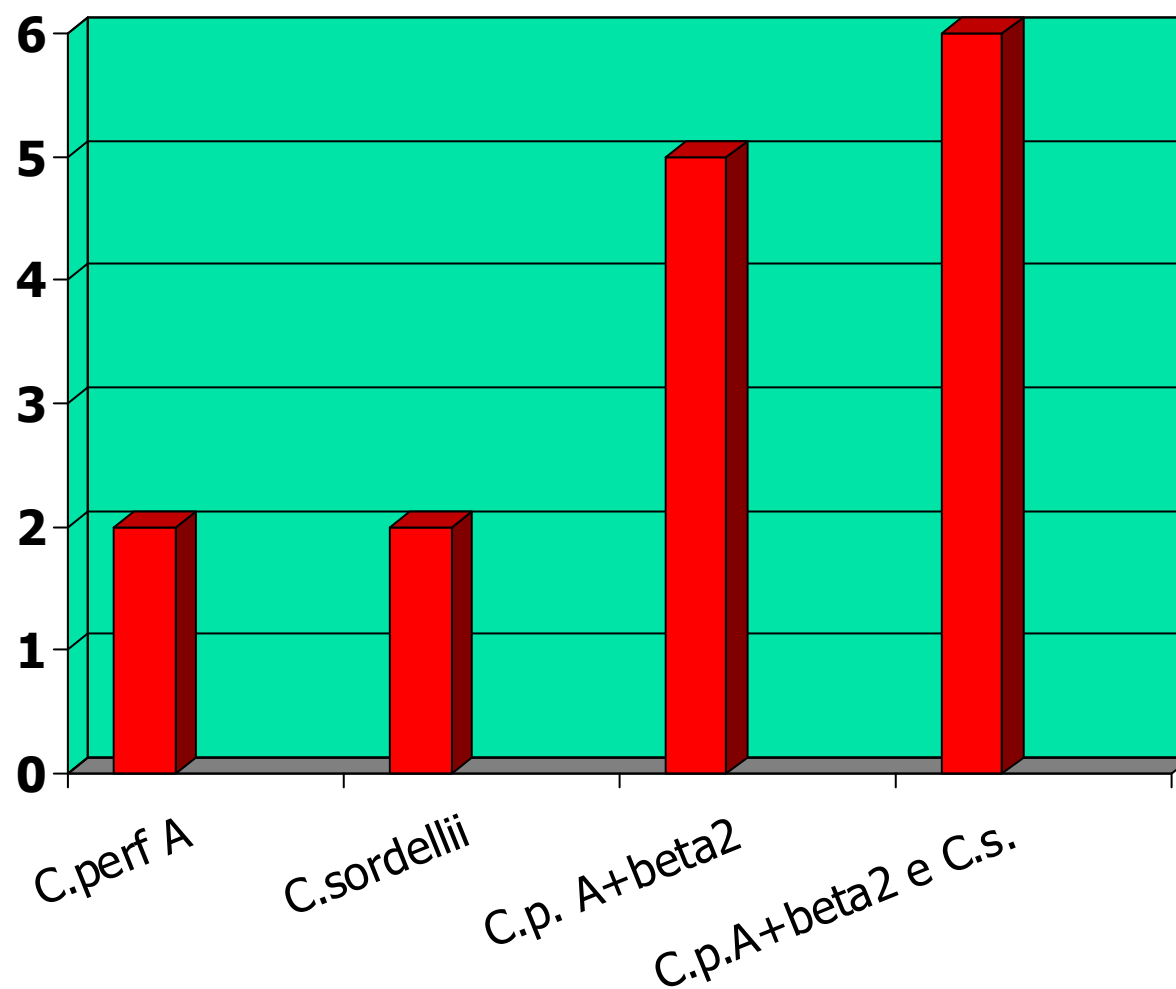
# Enterotossitemia e immunoprofilassi



# Tossina $\beta 2$ ed enterotossiemia

- Prova dell'ansa legata nel vitello  
(Manteca et al. 2002)

Punteggio  
lesioni  
intestinali



# *C. perfringens* e tossina $\beta 2$ nel bovino

- **Jost et al. 2005 Infect. Immun.**
- **Due varianti del gene cpb2**
  - la variante tipica (consensus) : **gene cpb2<sup>con</sup>**
  - la variante atipica: **gene cpb2<sup>aty</sup>**
  - La tossina  **$\beta 2^{\text{con}}$**  è **10 volte più tossica** rispetto alla tossina  **$\beta 2^{\text{aty}}$**
- **Lebrun et al. 2007, Vet. Microbiol.**
  - Tipizzazione di 41 cpb2 isolati positivi da **8 vitelli con enterotossiemia**
    - 100% **cpb2<sup>con</sup>**
    - 64% con espressione della tossina  **$\beta 2^{\text{con}}$**
  - Tipizzazione di 87 cpb2 isolati da **14 vitelli “controllo”**
    - 67% **cpb2<sup>con</sup>**
    - 22% con espressione della tossina  **$\beta 2^{\text{con}}$**





# I fattori di rischio per le enterotossiemie da clostridi

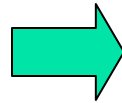




# Rumine e intestino

---

RUMINE



INTESTINO

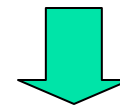
Fermentazioni anomale  
(Acidosi - Alcalosi)

> velocità di transito  
degli alimenti

Amido non degradato

Blocco della peristalsi

pH basico



**Alterazione della flora**



# I punti critici

Contaminazione  
degli  
alimenti

terra - micotossine (tricoteceni) - qualità dell'acqua

Gestione  
dell'insilato

Caricamento della trincea - copertura -  
desilamento (gestione del fronte di taglio)

Razionamento  
teorico

fibra/concentrati - amido - proteine - tamponi ...  
(eccessi e carenze)

Razionamento  
reale

preparazione del carro - modulazione (clima e altri fattori)

Condizioni  
patologiche

parassitosi intestinali - insufficienza epatica e/o  
pancreatica (acidi biliari, tripsina) - BVDV -  
immunodepressione (stress)

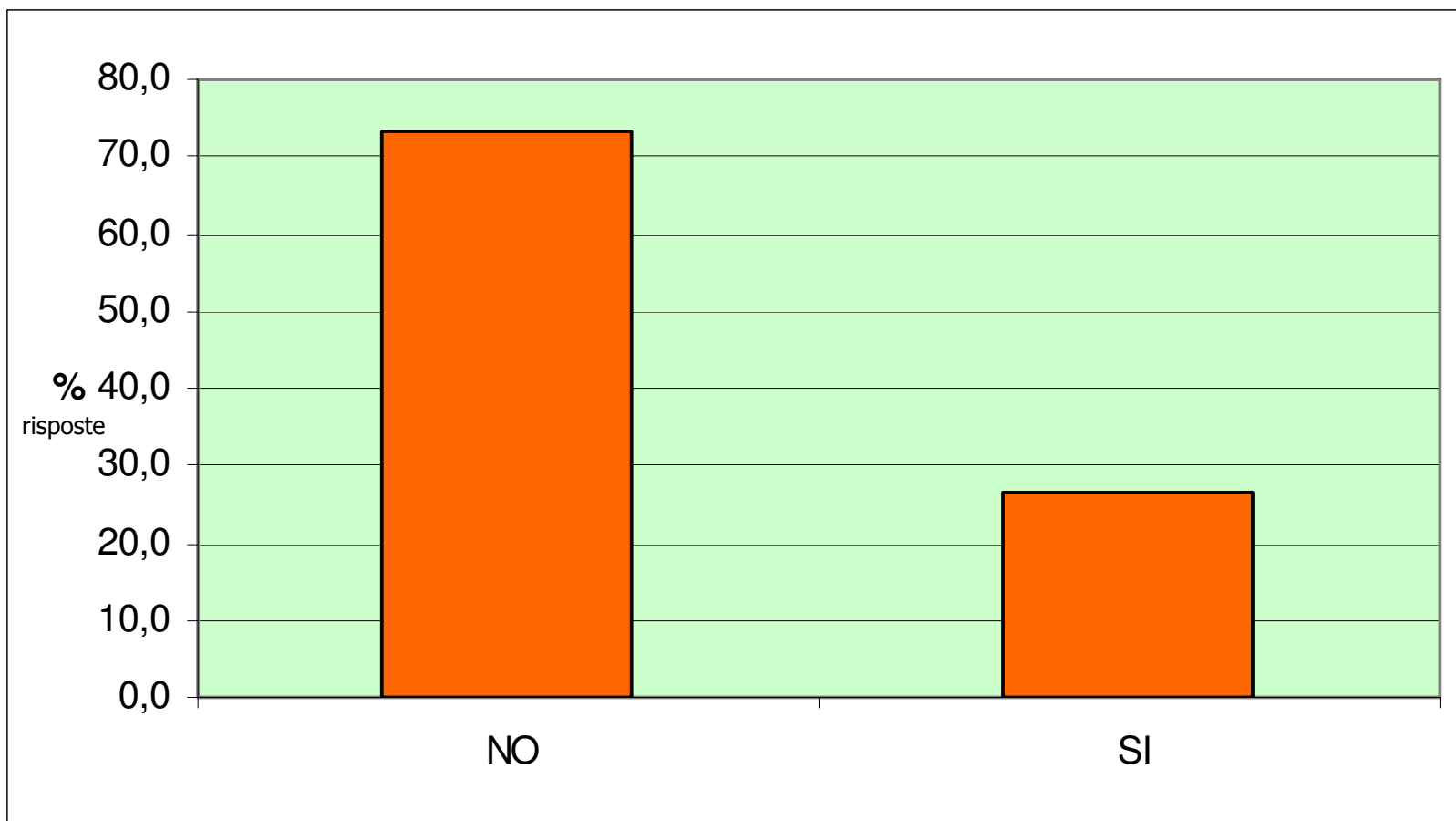




**BOTULISMO**

**Domanda a 15**  
**Veterinari di bovini**  
**da carne**

Hai avuto esperienza diretta di focolai di botulismo nel bovino da carne?





# Italia, 2008 (Treviso - Brescia)

## ASSESSORE DONAZZAN SU SOSPETTO DI INTOSSICAZIONE DA BOTULINO IN VACCHE DA LATTE IN PROVINCIA DI TREVISO

Comunicato stampa n° 1701 del 16/10/2008

(AVN) Venezia, 16 ottobre 2008

“In seguito ai recenti casi di decesso di alcuni capi bovini verificatisi in un’azienda agricola di Colle Umberto, Treviso, per presunta intossicazione da botulino, nei giorni fra sabato 16 e lunedì 18 ottobre, sono in corso gli accertamenti analitici su campioni di organo, di tessuto e di alimenti”. Lo dichiara Elena Donazzan, assessore alla Tutela del consumatore e sicurezza alimentare, che sottolinea: “L’avvelenamento ha riguardato un allevamento di vacche da latte con una consistenza di circa 40 soggetti, attualmente sono dieci i capi deceduti con sintomatologia riferibile a tossina botulinica; mentre uno è ancora vivo con la stessa sintomatologia, e cioè paralisi flaccida, debolezza e inappetenza.” “Sono tuttora - aggiunge Donazzan - in fase di accertamento le cause che hanno determinato l’intossicazione, verosimilmente provocata da alimenti contaminati. I servizi veterinari dell’Ulss 7 di Pieve di Soligo hanno posto immediatamente sotto vincolo sanitario l’azienda e hanno attivato tutte le misure di controllo con sequestro della stalla e eliminazione del latte e con blocco della commercializzazione fino agli esiti delle analisi di laboratorio.” “Il processo di pastorizzazione del latte - conclude l’assessore - abitualmente effettuato rende questo alimento sicuro sotto ogni punto di vista igienico-sanitario. Pertanto, si può affermare che non sussiste alcun pericolo per la salute pubblica derivante dal consumo di latte e di prodotti lattiero caseari.”

A cura dell’Ufficio Stampa della Regione Veneto



## Edizione del lunedì la Voce di Mantova

Anno 89 - N. 89

Quotidiano indipendente

Lunedì 31 marzo 2008

Abbonamento obbligatorio con La Stampa in Mantova e provincia - "Posta Italiana spa - spedizione in a.p. D.L. 353/03 (conv. L.46/04) art. 1 comma 1, DCB - Filiale di Mantova"  
Il mensile "Specchio" in abbonamento obbligatorio con Voce+Stampa il giorno di uscita al costo di euro 1,20. In abbonamento facoltativo con Voce+Stampa al costo di euro 2,00 per il resto del mese.

PANORAMA VIRGILIANO

## Batterio fa strage di frisoni in azienda di Carpenedolo

CARPENEDOLO (Bs) - Non si arresta la moria di animali che ha colpito l'allevamento di frisoni dei fratelli Luzzeri a Carpenedolo, vicino al confine mantovano. Ieri, dopo i 100 capi morti giorni fa, altri animali non hanno resistito all'intossicazione. Così il conto degli esemplari morti è

salito a 106 capi su un totale di 238. Intanto proseguono gli accertamenti per stabilire con certezza il tipo di clostride che ha provocato l'intossicazione letale. L'agente batterico, secondo una prima ricostruzione ha trovato terreno fertile alla crescita all'interno di una delle rotoballe di fieno che vengono incelofanate quasi sottovuoto da speciali macchine. Una lavorazione che dovrebbe migliorare lo stato di conservazione, ma che in questo caso ha finito per alimentare la colonia di clostridi, di cui esistono un centinaio di specie, un quarto dei quali in grado di portare malattie letali nell'uomo e negli animali. L'Asl, per ora, ha posto sotto sequestro l'intera stalla fermando di fatto il conferimento del latte, la cui produzione è stimata, a pieno regime aziendale, sui 6mila quintali annui. (st.ghir.)



# Botulismo

---

- *Intossicazione alimentare*, altamente letale (neurotossina botulinica)
- *Paralisi muscolari flaccide progressive* (ascendenti o discendenti), nella maggior parte dei casi irreversibili





# LA NEUROTOSSINA BOTULINICA

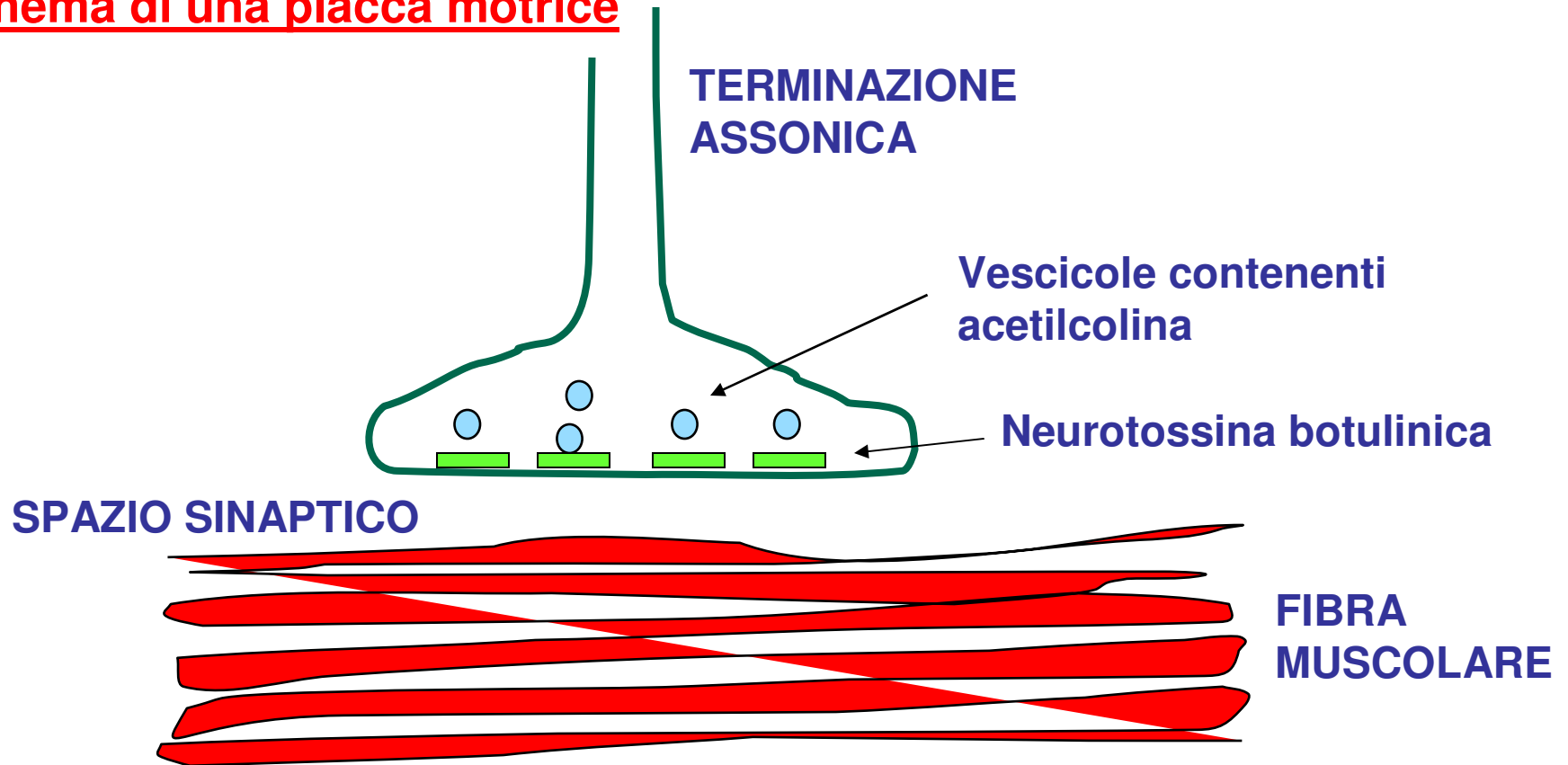
---

- *E' LA PIU' POTENTE TOSSINA BATTERICA CONOSCIUTA*
- *1 mg di tossina contiene 30 milioni DL<sub>50</sub> per il topo (Popoff, 1989)*
- *1 g di tossina pura può teoricamente essere letale per 400.000 bovini adulti (Galey et al., 2000)*

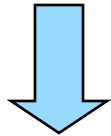
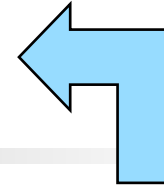


# Neurotossina botulinica: meccanismo d'azione

## Schema di una placca motrice



# Neurotossina botulinica



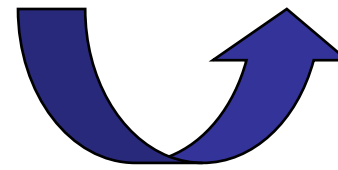
- *Polipeptide 150 kDa (termolabile)*
- *7 tipi immunologici (A,B,C,D,E,F,G)*

Spora



*C. botulinum*

Forma vegetativa



**pH: > 4,5**

**pot. redox: da -350 a + 250 mV**

**temperatura: da + 10° a + 50° C**

**acqua libera : > 0,94**

Carcasse di animali

Vegetali  
(insilati pH  
>4,5)

**Materiale organico  
in decomposizione**





## Neurotossine prevalenti

<b>Neurotoxin</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>
<b>Human</b>	X	X			X	X	
<b>Horses</b>		X	X				
<b>Cattle</b>		X	X	X			
<b>Sheep</b>			X				
<b>Dogs</b>			X	X			
<b>Avian</b>			X		X		
<b>Mink &amp; Ferret</b>	X		X		X		





## Elementi anatomo-clinici importanti

- *I sintomi compaiono da **2 a 14 giorni** dopo l'assunzione dell'alimento contaminato: atassia, paresi-paralisi, decubito permanente, coma, morte*
- ***L'evoluzione e la velocità del decorso clinico è variabile** da soggetto a soggetto (ore o giorni)*
- *All'esame necroscopico **non si evidenziano lesioni significative***

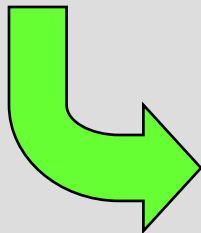


# BOTULISMO: esami di laboratorio (dimostrazione della tossina)



**Animale vivo  
(primi sintomi)**

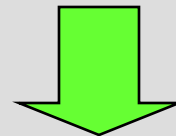
**Siero di sangue (20 ml)**



**Animale morto**

**Fegato (500 g)**

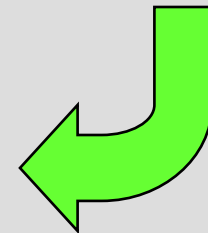
**Contenuto intestinale  
(50 ml)**



**Prelievo ambientale**

**Alimenti sospetti  
(500 g)**

**Carcasse animali**



**Prova biologica su topino**



## Cosa si può ... o si deve fare?

---

- *Necessaria una maggiore percezione del rischio (.. più informazione):*
  - *attenzione alle carcasse di piccoli animali che accidentalmente possono venire inglobate negli alimenti (rotoballe - insilati - unifeed)*
- *Banca del siero antitotulinico (C-D)*
- *Valutare l'opportunità di una polizza assicurativa contro eventi sanitari straordinari*

