



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

CLOSTRIDIUM BOTULINUM IN MATRICI
ALIMENTARI: MONITORAGGIO E PREVENZIONE

Relatore
Prof. Lorenzo Favaro

Laureanda
Sara Torreggiani

Matricola
n.1197973

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

RIASSUNTO

Clostridium botulinum, un patogeno alimentare è l'agente eziologico del botulismo. La tossina botulinica, infatti, viene assorbita dalla mucosa intestinale, arriva nel sangue e raggiunge le terminazioni neuromuscolari dove, impedendo la liberazione dell'acetilcolina, determina la comparsa di una paralisi flaccida.

Poiché le spore di *C. botulinum* sono ubiquitarie e si possono trovare in moltissimi luoghi, la contaminazione è difficile da evitare.

Questa patologia può risultare ancora più pericolosa quando a contrarla sono i neonati; in questo caso si parla di botulismo infantile e l'alimento principale che veicola le spore di *C. botulinum* è il miele.

Per questo è molto importante l'informazione e la conoscenza di questo microrganismo, in modo che il consumatore sappia comportarsi nel modo più adeguato e sappia applicare le norme igieniche necessarie e tutte le tecniche di prevenzione per evitare lo sviluppo del microrganismo.

Oltre a ciò, esistono molte tecniche diagnostiche per rilevare le tossine botuliniche. Esse comprendono sia le metodiche tradizionali, come la coltivazione in piastra, sia metodi più recenti e innovativi, quali le analisi di biologia molecolare tra le quali, la principale è l'amplificazione di specifici geni target tramite PCR (Polymerase Chain Reaction).

ABSTRACT

Clostridium botulinum, a foodborne pathogen is the etiologic agent of botulism. Botulinum toxin, in fact, is absorbed by the intestinal mucosa, reaches the bloodstream and reaches the neuromuscular endings where, by preventing the release of acetylcholine, it causes the onset of flaccid paralysis.

Because *C. botulinum* spores are ubiquitous and can be found in so many places, contamination is difficult to avoid.

This disease can be even more dangerous when infants contract it; in this case, it is called infant botulism, and the main food that carries *C. botulinum* spores is honey.

For this reason, information and knowledge about this microorganism is very important, so that the consumer knows how to behave in the most appropriate way and how to apply the necessary hygienic rules and all the prevention techniques to avoid the development of the microorganism.

In addition to this, there are many diagnostic techniques to detect botulinum toxins. They include both traditional methods, such as plate culture, and more recent and innovative methods, such as molecular biology analysis among which, the main one is the amplification of specific target genes by PCR (Polymerase Chain Reaction).

INDICE

1.0 INTRODUZIONE	5
2.0 IL GENERE CLOSTRIDIUM	6
2.1 CLOSTRIDIUM BOTULINUM	7
2.2 TOSSINA BOTULINICA E PATOLOGIA DEL BOTULISMO	9
2.3 BOTULISMO INFANTILE	11
3.0 CLOSTRIDIUM BOTULINUM NEGLI ALIMENTI	14
3.1 CASI DI BOTULISMO	15
3.2 DIAGNOSI E TRATTAMENTO DEL BOTULISMO INFANTILE	17
4.0 CONTROLLO DELLA CRESCITA MICROBICA	19
4.1 STERILIZZAZIONE COMMERCIALE	20
4.2 BATTERIOCINE E LA LORO ATTIVITA' ANTIBATTERICA	21
4.3 PREVENZIONE E TRATTAMENTI	23
5.0 MONITORAGGIO DEI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI	25
5.1 TERRENI DI COLTURA	27
5.2 DIAGNOSI IN LABORATORIO	28
5.3 METODI INNOVATIVI DI RICERCA	29
CONCLUSIONE	39
BIBLIOGRAFIA	41

1.0 INTRODUZIONE

Vi sono numerosissimi microrganismi di origine agro-alimentare che possono avere molteplici effetti sulla salute dell'uomo e degli animali.

Infatti, ci sono microrganismi positivi, i quali possono essere utili per la produzione di un determinato alimento (come le muffe per il gorgonzola), necessari (come per gli alimenti fermentati) oppure, addirittura, possono svolgere una funzione positiva (probiotici).

Purtroppo, ci sono anche molti microrganismi dannosi, che possono essere deterioranti e, quindi, danneggiare l'alimento (perdita di consistenza, produzione di odori sgradevoli) oppure patogeni.

Un microrganismo patogeno è un agente biologico capace di alterare lo stato di salute dell'ospite (il consumatore), portandolo a contrarre una patologia.

Esistono tre tipi di patologie:

- Intossicazione: patologia generata dalla produzione di tossine nell'alimento, che poi vengono ingerite, determinando la malattia. In questo caso, i tempi di incubazione¹ sono brevi (qualche ora).
- Infezione: patologia generata dallo sviluppo di un microrganismo all'interno del nostro corpo. Visto che il microbo deve moltiplicarsi nell'intestino, superare le barriere e colonizzare l'organismo, i tempi di incubazione sono molto lunghi (qualche settimana).
- Tossinfezione: patologia generata dallo sviluppo di un microrganismo nel nostro corpo e dalla produzione di tossine. I tempi di incubazione sono di qualche giorno.

In un alimento non è possibile garantire l'assenza di microrganismi patogeni, perciò, il nostro obiettivo deve essere quello di diminuire il rischio il più possibile, abbassando la crescita microbica.

¹ Tempo di incubazione: tempo che intercorre dal momento in cui viene ingerito il patogeno o le tossine, al momento della comparsa dei sintomi.

2.0 IL GENERE *CLOSTRIDIUM*

Clostridium è un genere che deve il suo nome alla parola greca *Kloster*, che significa fuso, dato che presenta una morfologia fusiforme bastoncellare.

Questo genere è antico, infatti è stato uno dei primi ad essere studiato (*Antonio Griguolo*).

Esso comprende molte specie eterogenee (aventi caratteristiche molto diverse tra loro) ed è ubiquitario, ovvero la sua presenza può essere riscontrata ovunque. Infatti, si può trovare nell'intestino umano (una grande quantità nel colon), nel suolo e, da qui, riesce a colonizzare tutti gli ambienti.

Questo genere comprende microrganismi di interesse alimentare (generalmente patogeni), ma anche industriale, in cui questo microrganismo è impiegato nella produzione di carburante o solventi. Ci sono anche dei ceppi proteolitici, che in alcuni alimenti rompono le proteine in peptidi ed oligopeptidi, che possono avere effetti sensoriali rilevanti determinando, per esempio, la produzione di peptidi amari con comparsa di odori e sapori sgradevoli.

Le specie di *Clostridium* più rilevanti sono le seguenti:

C. botulinum: è il più importante in ambito alimentare ed' è l'agente eziologico del botulismo.

C. perfringens: è una delle principali cause di avvelenamento da cibo (patogeno alimentare), ma meno importante e diffuso del precedente.

C. tetani: è l'agente eziologico del tetano, patologia affine al botulismo ma non di tipo alimentare.

C. difficile: è un patogeno ad habitat intestinale umano, molto diffuso in ambito ospedaliero.

C. tyrobutyricum: microrganismo deteriorante per gli alimenti (determina, ad esempio, gonfiore tardivo nei formaggi a lunga stagionatura, causando occhiature).

C. sporogenes: microrganismo che provoca rigonfiamenti nelle conserve.

Per quanto riguarda le caratteristiche morfologiche di questo genere, esso è a forma di bastoncello, è gram positivo ed è sporigeno.

Le spore vengono prodotte quando il microrganismo si trova in condizioni ambientali avverse, infatti il genere *Clostridium*, trovandosi molto spesso in ambienti ostili quali il suolo, deve trovare un modo per sopravvivere.

Il suolo rappresenta un ambiente non favorevole per due motivi principali: è un ambiente in cui vivono molti microrganismi diversi, perciò questo crea molta competizione; in più, il suolo è soggetto a rapidissimi cambiamenti causati, soprattutto, da agenti atmosferici (ad esempio la pioggia che toglie tutto l'ossigeno presente).

La spora rappresenta tipicamente una cellula viva ma non vitale poiché ha cessato tutte le sue attività metaboliche, ma non in modo irreversibile; infatti, quando le condizioni ambientali saranno di nuovo favorevoli, essa tornerà sotto forma di cellula vegetativa.

2.1 *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Il *C. botulinum*, come detto in precedenza, è la specie più famosa di patogeno alimentare; è stato isolato per la prima volta nel 1895 da un batteriologo belga.

Per quanto riguarda la sua morfologia, esso ha le stesse caratteristiche del genere: è un microrganismo Gram positivo ed è sporigeno, in particolare le spore sono formate a livello sub apicale; esse sono distrutte a 130°C in 3 minuti, mentre resistono per 3-5 ore a 100°C e diventano molto meno resistenti all'abbassarsi del pH. (*Brunt J, Plowman J, Gaskin DJH, Itchner M, Carter AT, Peck MW, 2014*)

Le dimensioni di questo microrganismo sono di circa 4-6 µm di lunghezza e non è un batterio mobile, sebbene provvisto di ciglia.

E' un anaerobio stretto, perciò teme l'ossigeno, in quanto a contatto con esso morirebbe (esiste, però, qualche ceppo di altre specie che ha acquisito una minima tolleranza).

Spesso, si pensa che il rigonfiamento nelle conserve, sia determinato da questo microrganismo, eppure non è così; infatti, il rigonfiamento è legato allo sviluppo di microrganismi sporigeni in cui il trattamento termico non ha inattivato le spore, ma il *C. botulinum* non produce gas, perciò, il rigonfiamento non può essere dovuto ad esso.

Come riportato in Tabella 1, all'interno di questa specie ci sono più suddivisioni, in particolare si riconoscono quattro gruppi: i primi due, quelli che ci interessano, contengono ceppi patogeni per l'uomo, il terzo contiene ceppi patogeni per gli animali (botulismo animale) e il quarto contiene ceppi non patogeni.

La patogenicità è dovuta alla produzione delle tossine: il *C. botulinum* produce 7 diversi tipi di tossine distinguibili dal punto di vista sierologico¹ (denominate dalla lettera A alla lettera G).

Esse sono diverse per ogni gruppo: il primo gruppo produce le tossine A,B,F, mentre il secondo le tossine E,B,F.

I due gruppi patogeni hanno delle differenze importanti tra di loro: il primo è proteolitico, ovvero è in grado di degradare le proteine, rompendo la loro struttura primaria; il secondo, invece, non ha questa funzione.

Si può creare, infatti, una suddivisione delle tossine sulla base delle loro proprietà biochimiche.

	GRUPPO 1	GRUPPO 2	GRUPPO 3	GRUPPO 4
TOSSINE	A,B,F	B,E,F	C,D	G
CARATTERISTICHE	proteolitico	Non proteolitico	Non proteolitico	proteolitico

Tab.1 Rappresentazione dei 4 gruppi di Clostridium botulinum e loro caratteristiche

Questa attività incide anche sulla patologia, poiché le tossine vengono prodotte in forma inattiva (pro-tossina) e vengono successivamente rese attive grazie al taglio del polipeptide fatto in un determinato punto. Perciò, nel caso del gruppo proteolitico, la tossina viene attivata direttamente nella cellula, mentre nel secondo gruppo, essa viene attivata nel nostro intestino grazie alla presenza di enzimi digestivi proteolitici.

¹ Siero: parte non corpuscolata del sangue che contiene gli anticorpi

Per quanto riguarda l'ecologia di questo microrganismo, anche in questo caso, bisogna fare una distinzione.

Infatti, i ceppi presenti nel primo gruppo sono mesofili e, quindi, sopportano una temperatura minima di 10°C e il loro optimum ¹ è di 35-40°C, mentre quelli appartenenti al secondo gruppo sono psicrotrofi ², con una temperatura minima di 3,3°C ed un optimum di 18-25°C.

Altri parametri importanti per quanto riguarda l'ecologia di questo microrganismo sono il pH e l'attività dell'acqua (Aw).

C. botulinum non cresce al di sotto di pH=4,6 (in alimenti acidi, infatti, non si sviluppa) e di Aw inferiore a 0,94.

2.2 TOSSINA BOTULINICA E PATOLOGIA DEL BOTULISMO

La patologia causata da questo microrganismo è il botulismo, ovvero un'intossicazione.

L'intossicazione è una patologia generata, normalmente, da una molecola che può essere una sostanza elementare (ad esempio l'intossicazione da fumo) oppure una tossina, come in questo caso.

Infatti, le molecole tossiche vengono prodotte nell'alimento e poi vengono ingerite, determinando la patologia. È, quindi, l'ingestione della tossina a causare il botulismo, non l'ingestione delle spore o del batterio vitale.

La tossina botulinica è un veleno molto serio e pericoloso; infatti, è uno dei più potenti esistenti, già in quantità 0,1-1µg può provocare la morte.

Come si può vedere in Figura 1, essa viene sintetizzata inizialmente in forma inattiva (pro-tossina) come singolo peptide, ha una forma semicurva, mantenuta grazie ad un ponte disolfuro costituito da due atomi di zolfo³.

¹ Optimum: temperatura ottimale, in cui il tasso di crescita è massimo e il tempo di generazione è minimo.

² Psicrotrofi: microrganismi che hanno le temperature ottimali intorno ai 20-30°C, molto simili ai mesofili ma con la differenza che essi metabolizzano anche a temperature di refrigerazione.

³ Atomi di zolfo: essi derivano da due amminoacidi solforati: la cisteina e la metionina.

Come detto in precedenza, per essere attivata, bisogna fare un taglio in un punto specifico, in modo che si formino due catene differenti: la catena pesante H e la catena leggera L.

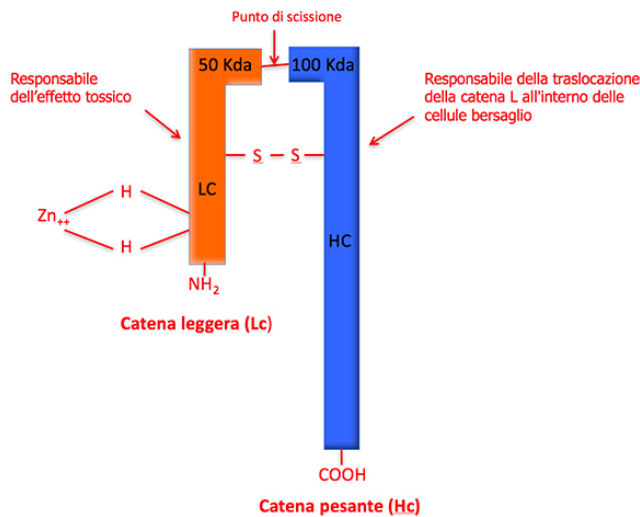


Figura 1. Struttura della tossina botulinica

Questa è un'esotossina¹ termosensibile, per cui viene inattivata con una buona cottura (80°C in pochi minuti). Essa è, inoltre, resistente all'azione dei succhi gastrici, perciò, i sintomi si verificano dopo circa 18-96 ore dall'ingestione dell'alimento.

Il botulismo, nell'essere umano, si presenta in differenti forme:

- botulismo alimentare: *C. botulinum* si può sviluppare negli alimenti solo in determinate condizioni (come l'anaerobiosi).
- botulismo da ferita: si presenta quando avviene un contatto tra una ferita e le spore di questo microrganismo presenti nell'ambiente.
- botulismo infantile: causati dalle spore di *C. botulinum* che vengono ingerite e raggiungono l'intestino.

La tossina botulinica è una neurotossina, in quanto ha effetto sul sistema nervoso.

¹ Esotossina: molecole di natura proteica con funzione enzimatica, prodotte sia da microrganismi Gram+ che Gram-.

Normalmente, quando mandiamo uno stimolo, la fibra nervosa porta l'impulso e poi, lo stimolo elettrico deve passare al tessuto muscolare. Questo avviene tramite il rilascio, da parte delle terminazioni nervose, di un effettore chiamato acetilcolina. La catena leggera (L) è un enzima proteasi che attacca una delle proteine della giunzione neuromuscolare impedendo il rilascio di acetilcolina dalle vescicole. Inibendo il rilascio di questo neurotrasmettitore, la tossina interferisce con l'impulso nervoso, impedendo così, alle fibre muscolari di contrarsi e causando la paralisi flaccida dei muscoli, che è una caratteristica tipica del botulismo. Essa si trova in contrapposizione alla paralisi spastica causata dal *C. tetani*, agente eziologico del tetano, nel quale si verifica una produzione continua di acetilcolina, che impedisce il rilassamento dei muscoli. Esiste, tuttavia, una terapia per questa patologia, che consiste nell'assunzione dell'antitossina, molecola che va a bloccare l'azione della tossina oppure in altri trattamenti farmacologici.

Altri sintomi provocati dalla tossina botulinica sono debolezza, scoordinazione dei muscoli della faringe e dei muscoli volontari, difficoltà del movimento e nei casi più gravi la paralisi dei muscoli respiratori, come il diaframma.

La tossina botulinica, se diluita, diventa un farmaco utilizzato, per esempio, in medicina estetica (botox).

2.3 BOTULISMO INFANTILE

Il botulismo infantile, del quale si è avuta la prima segnalazione nel 1976, è una particolare forma di botulismo che colpisce i bambini molto piccoli, anche al di sotto di 12 mesi di età. Non è causato, come detto in precedenza, dall'assorbimento della tossina, bensì dalle spore presenti negli alimenti, facenti parte dell'alimentazione dei lattanti.

La maggior parte dei casi è determinata da tossine di tipo A e B ed interessa neonati di età inferiore a 6 mesi.

Grazie a ricerche di laboratorio e studi epidemiologici è stato accertato che il miele rappresenta uno dei più importanti serbatoi di spore di *C. botulinum* e che, quindi, la principale causa di botulismo infantile possa essere ricercata nel consumo di tale alimento.

Le spore in esso contenute sono in grado di germinare a livello del colon, con la successiva produzione della tossina, la quale provoca sintomi riconducibili alla patologia classica.

Questo non accade nell'adulto o in bambini al di sopra dell'anno di età, poiché la flora intestinale è già sviluppata e il microbiota è in grado, quindi, di proteggere il nostro intestino, cosa che non succede nei neonati (classificati, per questo, come categoria a rischio).

Recentemente, inoltre, si è resa nota la presenza di spore di *C. botulinum* in fiori di camomilla e altri vegetali disidratati utilizzati per preparare infusi ai lattanti, consuetudine molto diffusa in diversi Paesi, tra cui l'Italia; questo solleva il problema di altre eventuali fonti di spore botuliniche, diverse dal miele, che potrebbero rappresentare un fattore di rischio per i neonati ed essere eventualmente sconsigliate, così come il miele, almeno in un determinato periodo di vita.

Tuttavia, l'ingestione delle spore non rappresenta una condizione sufficiente allo sviluppo di questa patologia: tra altre le cause viene attribuita particolare importanza alle caratteristiche della flora intestinale che può essere modificata dall'uso di antibiotici o alle alterazioni della risposta immunitaria. I sintomi di questa patologia sono vari: ci sono casi asintomatici ma anche casi molto gravi. Inizialmente, manifestano sintomi gastrointestinali, per poi avere problemi neurologici in seguito come la paralisi discendente, che coinvolge dapprima la testa e poi il tronco e gli arti. Il sintomo più comune è la costipazione, che può durare da diversi giorni a settimane.

Gli ultimi sintomi a manifestarsi sono la riduzione della capacità motoria e la perdita dei riflessi tendinei.

Come riportato, tra gli alimenti per la prima infanzia, i maggiori sospetti sono rivolti sul miele, nonostante esso sia da ritenersi non solo uno dei più sani, ma anche uno dei più sicuri dal punto di vista microbiologico. Le sue caratteristiche fisico-chimiche sono infatti tali da porlo al riparo dal rischio di un possibile sviluppo batterico.

Esso presenta un'elevata concentrazione zuccherina ed è caratterizzato dalla presenza di un enzima: l'enzima glucosio ossidasi. Il Glucosio ossidasi è

introdotto nel miele già durante la raccolta del nettare. Esso, a partire dal glucosio, in particolari condizioni, produce perossido di idrogeno (acqua ossigenata) e acido gluconico. Proprio il perossido di idrogeno accumulato nel miele svolgerebbe la sua attività antimicrobica.

Ma sono altri due i fattori intrinseci che limitano maggiormente lo sviluppo microbico : il pH¹ e l'Aw². Il miele è un alimento con un pH acido, dovuto alla presenza di acidi organici, sia liberi che combinati; infatti, il suo pH finale varia da 3,5 a 5,5, valori che sono in grado di limitare fortemente lo sviluppo della maggior parte delle specie batteriche.

Analogha considerazione può essere fatta per quanto attiene al parametro Aw, che nel miele raggiunge valori di 0,58-0,74, a seconda della percentuale di umidità, di zuccheri e dello stato fisico del miele stesso (liquido o cristallizzato).

I patogeni alimentari, per svilupparsi negli alimenti hanno bisogno, di norma, di un'Aw di almeno 0,90 perciò, è comprensibile come gli unici batteri in grado di sopravvivere in una matrice così ostile siano quelli in grado di produrre spore, appartenenti ai generi Bacillus e Clostridium.

Per quello che riguarda la relazione tra miele e botulismo infantile, anche se il miele prodotto industrialmente è molto controllato, esso non è indispensabile per l'alimentazione infantile e quindi il rischio di veicolare il botulismo con il miele può facilmente essere eliminato. Queste considerazioni hanno portato alla raccomandazione diffusa dall'autorità sanitaria statunitense di non somministrare miele a bambini di meno di un anno di età. Questa conclusione si è raggiunta perché le conseguenze di questa patologia, in rari casi possono essere anche molto gravi. (*Griglio, B., Galvagno, G., Sattanino, G., Rossignoli, M., & Musella, C. 2004*)

¹ pH: parametro che misura la concentrazione di ioni idrogeno (protoni).

² Aw: parametro che indica la quota di H₂O disponibile in un prodotto alimentare in quanto non integrata in legami intramolecolari e pertanto utilizzabile dai batteri per il loro metabolismo.

3.0 CLOSTRIDIUM BOTULINUM NEGLI ALIMENTI

Come già sottolineato in precedenza, il *C. botulinum* è un microrganismo sporigeno e le sue spore sono ubiquitarie; perciò, si possono trovare in molti ambienti.

Per quanto riguarda gli alimenti, tuttavia, non sono tutti a rischio contaminazione. Un prodotto alimentare è a rischio solo nel caso in cui le spore di questo microrganismo trovassero le condizioni favorevoli per svilupparsi.

Un'altra delle caratteristiche principali di questo patogeno alimentare è il suo rapporto con l'ossigeno: esso è un anaerobio stretto, perciò in presenza di ossigeno muore. Per questa ragione, ci sono alimenti in cui il *C. botulinum* non potrebbe mai svilupparsi, come gli alimenti freschi (pasta, pane, ecc.).

Esso, come detto in precedenza, è un microrganismo che ha come habitat principale il suolo (contaminazione primaria). Per questo motivo, gli alimenti più a rischio di contaminazione sono quelli a contatto con esso come i vegetali, soprattutto quelli a bassa acidità (piselli, carote, mais, peperoni).

Ma anche gli animali sono soggetti a contaminazione, infatti la larga distribuzione delle spore fa sì che esse possano venire ingerite da diversi animali e si ritrovano così nell'intestino di molti mammiferi e pesci, oltre che nei fondali marini e lacustri. Altri alimenti ad elevato rischio sono le conserve¹ e le semi-conserve che non hanno subito trattamenti di acidificazione o fermentazione (il pH deve essere maggiore di 4,6), nelle quali l'aggiunta di olio crea l'anaerobiosi necessaria allo sviluppo del microrganismo. Ovviamente, saranno più a rischio le conserve prodotte in ambito domestico rispetto a quelle industriali, poiché in queste ultime c'è un grande controllo dello sviluppo microbico; invece, tutti gli alimenti prodotti dal consumatore sono soggetti a errori da parte di quest'ultimo, poiché è disinformato riguardo quest'ambito.

Gli alimenti di produzione domestica che sono soggetti maggiormente a casi di botulismo sono le conserve vegetali, le salsicce, in cui le tossine presenti sono

¹ Conserve: prodotto microbiologicamente sterile, la cui conservabilità non è influenzata dall'ambiente esterno

quelle di tipo A e B; inoltre sono a rischio anche alimenti essiccati o sotto sale, pesci marinati o fermentati nei quali, invece, sono presenti le tossine di tipo B ed E.

Sono stati studiati casi di botulismo adulto per identificare le differenze cliniche tra i tipi di tossine e per valutare la sensibilità dei test diagnostici di laboratorio. I pazienti con malattia da tossina di tipo E avevano i periodi di incubazione più brevi. I pazienti sporadici erano più gravemente malati: l'85% ha richiesto l'intubazione. Dei pazienti con botulismo di tipo A, il 67% ha richiesto l'intubazione rispetto al 52% del tipo B e al 39% del tipo E.

Da questo studio, si è concluso che i pazienti con botulismo di tipo A hanno una malattia più grave. (Woodruff, B. A., Griffin, P. M., McCroskey, L. M., Smart, J. F., Wainwright, R. B., Bryant, R. G., ... & Hatheway, C. L. ,1992)

3.1 CASI DI BOTULISMO

CASO DI *C. BOTULINUM* IN TIRAMISU'

Il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo ha messo alla luce il seguente caso.

Alla fine del 1996, un'epidemia di botulismo colpì otto giovani (l'età dei pazienti variava dai 6 ai 23 anni) in Italia. L'esordio della malattia è stato lo stesso per tutti questi pazienti: sintomi gastrointestinali (nausea e vomito) seguiti da sintomi neurologici. La tossina botulinica è stata rilevata rispettivamente in due dei cinque sieri e sei campioni di feci analizzati, mentre le spore di *Clostridium botulinum* tipo A sono stati recuperati dalle feci di tutti i pazienti. L'indagine epidemiologica ha portato a sospettare che un formaggio cremoso commerciale (mascarpone) fosse fonte di tossina botulinica: era stato infatti mangiato da tutti i pazienti prima della comparsa dei sintomi, sia da solo che come ingrediente (crudo) di un dessert: il Tiramisù. La tossina botulinica di tipo A è stata rinvenuta negli avanzi di tiramisù consumati da due pazienti e in alcuni campioni di mascarpone prelevati negli stessi punti vendita dove gli altri pazienti avevano precedentemente acquistato i loro formaggi. Una rottura della catena del freddo al dettaglio ha probabilmente causato la germinazione del *C. botulinum* spore

che contaminano i prodotti, con conseguente produzione della tossina. Uno dei pazienti è morto, mentre gli altri si sono ripresi molto lentamente. Il tempestivo allarme internazionale e il richiamo del mascarpone hanno impedito la diffusione dell'epidemia a causa dell'ampio raggio di distribuzione, dimostrando l'importanza di un sistema di sorveglianza rapida (RASFF).

CASO DI BOTULISMO IN CONSERVE DOMESTICHE

Un altro caso rilevante è avvenuto nella provincia di Viterbo.

Nel 2015, ci fu un caso di botulismo alimentare segnalato da una donna di 57 anni.

I sintomi erano quelli classici della malattia: dolori gastrointestinali, disfagia, diplopia. Dalle analisi è emerso che la paziente aveva mangiato peperoncini ripieni sott'olio confezionati da lei alcuni giorni prima; erano stati prodotti seguendo tecniche tradizionali ritenute appropriate. Tuttavia, questa procedura si è dimostrata pericolosa per la salute.

Analizzando in modo più approfondito il caso della paziente emergono gli errori fatti, tra cui la bollitura insufficiente per l'inattivazione delle spore. Essa è efficace soltanto per le conserve acide (pH inferiore a 4,5) e per le confetture, in cui la quantità di zucchero è elevata.

Un altro errore è stato riutilizzare dei tappi senza un adeguato trattamento: è meglio utilizzare una volta sola i coperchi, per evitare possibili alterazioni di forma che potrebbero non consentire il sottovuoto.

Inoltre, il mantenimento degli alimenti in frigorifero, pur rallentando fortemente la degradazione dei cibi, non la impedisce. Pertanto, è importante sottolineare che, dal momento in cui il prodotto risultasse alterato deve essere immediatamente eliminato. Questo caso sottolinea la necessità di una maggiore consapevolezza su come prevenire e gestire correttamente i casi di botulismo.

Nella prevenzione del botulismo è fondamentale il rispetto delle procedure igieniche corrette per la conservazione degli alimenti e la produzione di insaccati, sia in ambito domestico, sia a livello industriale.

3.2 DIAGNOSI E TRATTAMENTO DEL BOTULISMO INFANTILE

Il botulismo infantile è stato rilevato per la prima volta circa 30 anni fa, eppure è tutt'ora una patologia poco conosciuta e spesso confusa con altre. La diagnosi clinica di questa malattia si basa esclusivamente sui sintomi neurologici, come la paralisi.

L'analisi in laboratorio, invece, si effettua andando ad analizzare il siero o le feci del paziente e cercando la tossina botulinica o la presenza di spore di *C. botulinum*.

La prima identificazione di casi di botulismo infantile risale al 1984, quando è stato creato un programma per monitorare attivamente la malattia e studiarla.

Le analisi di laboratorio coinvolgono campioni biologici, ambientali ed alimentari; questi ultimi vengono analizzati in quanto costituiscono il veicolo delle spore e, in particolare, l'alimento maggiormente interessato è il miele.

In merito a questo alimento, essendo destinato al consumo umano, deve sottostare alla normativa vigente in materia di etichettatura (Reg. CE no. 1169/2011). Questa prevede che l'etichetta riporti, oltre alle informazioni obbligatorie (la denominazione di vendita, la quantità netta, il termine minimo di conservazione, la sede dello stabilimento di produzione, il paese di origine e il lotto), anche eventuali informazioni facoltative. Tra queste, la dicitura "il miele non è adatto all'alimentazione dei lattanti (età inferiore ai 12 mesi)" che rappresenterebbe un elemento indispensabile per la tutela della salute del consumatore e una misura precauzionale contro possibili intossicazioni.

È stato confermato che l'unico rischio biologico legato all'assunzione di miele riguarda il botulismo infantile, tuttavia, non è ritenuto obbligatorio inserire tale dicitura in etichetta, poiché le modalità di trasmissione sono ancora sconosciute e il rischio relativo al botulismo infantile in Europa è estremamente basso.

Come detto in precedenza, i neonati sono più soggetti a questa patologia a causa della loro flora intestinale caratterizzata da un minor numero di specie batteriche. Un fattore che ha una grande influenza sulla composizione della flora intestinale è il tipo di alimentazione che ha il neonato (allattamento al seno, alimentazione artificiale o alimentazione mista).

Inoltre, la composizione della flora intestinale subisce variazioni nel tempo, soprattutto quando si introducono alimenti solidi, come i cereali, nella dieta del bambino.

La normale microflora intestinale del neonato comprende alcune specie di batteri che, in studi di laboratorio, possono inibire la crescita del *C. botulinum*. Tuttavia, non si è potuta stabilire una relazione tra il tipo di dieta e l'insorgenza della malattia. Infatti, nonostante la maggior parte dei pazienti fosse allattata al seno, la malattia si manifestava in età più precoce nei neonati alimentati con latte artificiale. Questo potrebbe essere attribuito alla presenza di ambienti favorevoli nel latte in polvere e alla mancanza di fattori immunitari (come le immunoglobuline A e la lattoferrina¹), presenti nel latte materno. Questi fattori possono portare ad una microflora intestinale non equilibrata e ad un sistema immunitario del neonato più fragile.

Il trattamento del botulismo infantile prevede l'uso dell'antitossina botulinica, la quale viene somministrata in modo lento attraverso un'iniezione endovenosa. Questa antitossina è composta da immunoglobuline ottenute da donatori che possiedono elevati livelli di anticorpi contro la tossina botulinica.

Gli antibiotici, invece, non sono efficaci in questo caso, poiché il principale problema riguarda la tossina già prodotta dai batteri e la loro azione non è rivolta contro la tossina stessa.

¹ Lattoferrina: proteina con funzione enzimatica, costituisce una difesa contro i microrganismi patogeni

4.0 CONTROLLO DELLA CRESCITA MICROBICA

Come si vede in Figura 2, quando si descrive la crescita dei microrganismi si utilizza sempre la scala logaritmica, che consente di riportare la crescita esponenziale.



Figura 2. *Rappresentazione della curva di crescita microbica*

Nel caso dei microrganismi patogeni, lo scopo che si vuole raggiungere è diminuire il più possibile la crescita microbica e, quindi, la fase esponenziale del grafico.

Per controllare la crescita microbica si possono utilizzare sia metodi fisici che chimici.

I metodi fisici comprendono:

- Filtrazione: consiste nella separazione fisica dei microrganismi.
- Radiazioni: possono essere non ionizzanti (raggi UV) oppure ionizzanti (raggi X e raggi γ) che agiscono sul DNA, danneggiandolo; si possono utilizzare per sterilizzare alimenti freschi e carne.
- Liofilizzazione¹ e disidratazione: in questo modo si riesce ad allontanare l'acqua e bloccare la crescita.
- Pressione osmotica: porta a disidratazione.
- Temperatura: esso è il parametro più importante per controllare la crescita batterica, infatti, può essere modificata in tutti i tipi di alimenti.

¹ Liofilizzazione: metodo di essiccazione, in cui il materiale da essiccare viene prima congelato e poi portato allo stato di vapore. Utilizzato per la conservazione degli alimenti.

Effetto della Temperatura

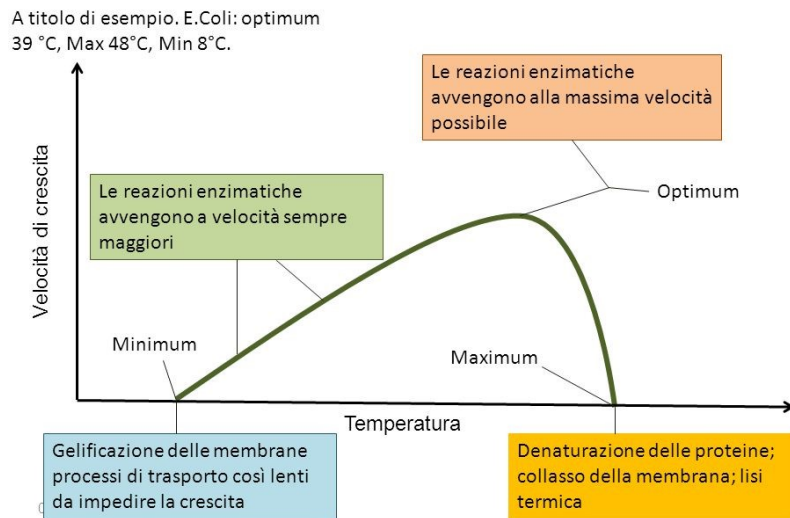


Figura 3. *Rappresentazione dell'effetto della temperatura sul tasso di crescita dei microrganismi*

Come si vede dal grafico in figura 3, esiste una temperatura minima al di sotto della quale il microbo non cresce, poiché viene fornita troppa poca energia. Queste temperature vengono definite batteriostatiche; infatti, il microbo non muore ma cessa solo di metabolizzare.

Perché il microbo muoia, si deve raggiungere la temperatura massima.

Essa porterebbe al danneggiamento di metabolismi essenziali per la sopravvivenza, come la denaturazione di enzimi molto importanti.

Da ciò, possiamo dedurre quanto la temperatura sia importante per controllare la crescita.

Infatti, esistono metodi che sfruttano il calore umido, come la sterilizzazione e la pastorizzazione, che portano alla denaturazione delle proteine.

Altri metodi utilizzano il calore secco (stufe ad aria calda).

4.1 STERILIZZAZIONE COMMERCIALE

Il trattamento fisico più valido per controllare la crescita microbica è la sterilizzazione, che costituisce il metodo di conservazione degli alimenti più importante. Con il termine sterilizzazione si comprendono soprattutto quei

trattamenti a temperature elevate (maggiori di 100 °C) applicati ai prodotti a più alto rischio di contaminazione e che avvengono in autoclave, un apparecchio sotto pressione (tra gli alimenti più a rischio ci sono le conserve alimentari, nelle quali si sviluppa il *C. botulinum*).

Il trattamento di sterilizzazione è associato ad un parametro chiamato F_0 , che indica le condizioni per ottenere la sterilità nel caso della presenza di spore e alla temperatura più alta utilizzata (121°C). Esso fornisce, quindi, tutte le informazioni su come ottenere la sterilizzazione commerciale alla temperatura di 121°C e con un valore di $Z^1=10$.

Per ottenere con certezza la morte di tutte le cellule microbiche presenti, si considera la situazione peggiore e, quindi, il microrganismo patogeno più termoresistente, ovvero il *C. botulinum* e, in particolare, quelli appartenenti al primo gruppo (con $Z=10$ e $D_{121}=0,1-0,2$ minuti).

Poiché la formula per calcolare il parametro F è la seguente: $F=nD$ (dove n =numero di riduzioni decimali e D = tempo di riduzione decimale), bisogna determinare “ n ” e, sperimentalmente, si è deciso di abbassare la popolazione di 12 logaritmi, in cui ci saranno un numero di casi di *C. botulinum* accettabili.

La formula, perciò, risulterà la seguente:

$$F_0: 12 \times 15 = 180 \text{ secondi} = 3 \text{ minuti}$$

Da questo si deduce che per uccidere una quantità sufficiente di cellule di *C. botulinum* e, quindi, ottenere un alimento sicuro è necessario un trattamento termico di sterilizzazione di 3 minuti a 121°C.

4.2 BATTERIOCINE E LA LORO ATTIVITA' ANTIBATTERICA

Come detto in precedenza, per controllare la crescita microbica si possono utilizzare i mezzi fisici elencati sopra oppure anche metodi chimici.

Essi possono comprendere:

- Agenti antimicrobici: composti chimici, naturali o di sintesi che uccidono i microrganismi oppure ne inibiscono la crescita (es. antibiotici, detergenti)

¹ Parametro Z : indica di quanti gradi va alzata la temperatura di trattamento per ottenere una morte delle cellule 10 volte più rapida

- Sanitizzanti: utilizzati molto nell'industria alimentare per trattare superfici utilizzate per miscelare cibi
- Sterilizzanti
- Disinfettanti

Tra gli antimicrobici più importanti ci sono le batteriocine, tossine di natura proteica che agiscono inibendo la crescita di numerose specie batteriche, comprese quelle patogene; sono dotate, quindi, di attività battericida e batteriostatica. Esse agiscono mediante formazione di canali ionici a livello della membrana citoplasmatica e aderiscono alle cellule bersaglio, grazie alla presenza di specifici recettori. Le batteriocine vengono create attraverso la sintesi ribosomiale come peptidi inattivi; per diventare completamente maturi e funzionanti, questi peptidi vengono tagliati lungo la loro sequenza leader N-terminale e successivamente traslocati all'esterno della cellula tramite un sistema di trasporto ABC. L'azione delle batteriocine è rivolta direttamente verso la membrana citoplasmatica sia dei Gram positivi sia dei Gram negativi.

Esse sono molto utili in ambito alimentare poiché, grazie alla loro attività antimicrobica, possono essere utilizzati come bioconservanti naturali, per contenere e controllare la popolazione batterica indesiderata, che potrebbe essere responsabile di intossicazioni.

Tuttavia, non sono molte le batteriocine che possono essere impiegate in ambito alimentare: la nisina e la pediocina sono le uniche in commercio.

Ci sono batteriocine, come le coagulina e termofilina che inibiscono la crescita dei Clostridi produttori di tossine botuliniche.

Tuttavia, la principale batteriocina utilizzata per contrastare il *Clostridium botulinum* è la nisina.

La nisina è un peptide antibatterico composto da 34 aminoacidi ed è prodotta da specifici ceppi del batterio *Lactococcus lactis*. La sua azione altera l'equilibrio osmotico, il potenziale di membrana ed inibisce la sintesi della parete.

Questa sostanza è ampiamente utilizzata come conservante alimentare grazie alle sue proprietà non tossiche, alla sua capacità di resistere al calore (resiste alla pastorizzazione e alla sterilizzazione) a pH acido e, soprattutto, alla sua

efficacia contro numerosi batteri patogeni Gram-positivi, tra cui il *Clostridium botulinum*.

Questo potrebbe, però, risultare uno svantaggio: potrebbe, infatti, portare al rischio di sviluppare una resistenza o di creare condizioni favorevoli allo sviluppo di batteri Gram negativi mediante l'eliminazione della microflora Gram-positiva indigena.

Vista la sua propensione a pH acidi, essa risulta particolarmente attiva al pH della frutta e di alcuni ortaggi.

Il motivo per il quale essa è particolarmente attiva contro il *C. botulinum* è che la sua produzione viene ridotta dall'areazione quindi la biosintesi della nisina avviene meglio in condizioni anaerobiche.

Tuttavia, l'utilizzo della nisina è limitato dalla sua solubilità e stabilità che diminuiscono progressivamente all'aumentare del pH ambientale. La nisina esiste sottoforma di due varianti naturali: nisina A e nisina Z. Quando il peptide maturo interagisce con la membrana citoplasmatica delle cellule sensibili, crea dei pori che causano la dispersione del potenziale di membrana, dei gradienti di pH e la fuoriuscita di composti essenziali (ioni K⁺, amminoacidi e ATP) e si arriva, perciò, a morte cellulare.

4.3 PREVENZIONE E TRATTAMENTI

Il *C. botulinum*, come abbiamo visto, in alcuni casi può portare anche a gravi conseguenze.

Per questo, bisogna cercare di prevenire lo sviluppo di questo microrganismo negli alimenti per evitare di contrarre la patologia.

La profilassi¹ si effettua andando ad agire sul trattamento termico e sull'acidità degli alimenti, poiché il *C. botulinum* non è un microrganismo acidofilo.

L'intensità del trattamento termico deve tenere in considerazione dove verrà conservato l'alimento.

Infatti, se esso verrà conservato a temperatura ambiente bisogna effettuare il trattamento di sterilizzazione commerciale; se, invece, un alimento è conservato

¹ Profilassi: le norme e i provvedimenti che si devono adottare per la difesa contro determinate malattie

in frigorifero si può effettuare anche un trattamento più blando, in quanto i clostridi del primo gruppo, che sono mesofili, non si svilupperanno, mentre quelli del secondo gruppo (psicrotrofi) possono svilupparsi ma presentano una termoresistenza minore.

Un altro fattore sul quale si può intervenire è l'attività dell'acqua, che può essere abbassata al di sotto di 0,94, in modo che il microrganismo non possa svilupparsi. Essenziali per prevenire qualsiasi tipo di sviluppo microbico sono l'igiene e la pulizia sia degli alimenti, sia di tutto ciò che viene a contatto con essi; in particolar modo, bisogna fare attenzione a tutti quegli alimenti a stretto contatto con il suolo, che devono essere lavati con cura prima di essere utilizzati, per esempio, per fare una conserva. In questo caso, bisogna assicurarsi di utilizzare l'attrezzatura corretta, sterilizzare tutti i contenitori in modo adeguato e conservare il prodotto nella maniera adatta.

Si possono utilizzare anche nitrati e nitriti, che vengono aggiunti per allungare la shelf-life degli alimenti e come conservanti, poiché sono essenziali per evitare lo sviluppo di microrganismi patogeni, come il *C. botulinum*. Essi vengono utilizzati molto soprattutto nella conservazione della carne e degli insaccati, per mantenere il colore rosso e migliorare il sapore; in più vengono aggiunti contro l'ossidazione dell'emoglobina in metaemoglobina, ma possono subire delle modificazioni chimiche, legandosi con ammine che li trasformano in nitrosammine, molecole potenzialmente cancerogene. Questo aspetto è particolarmente pericoloso per i bambini ed i neonati che assorbono maggiori quantitativi di nitriti dalla loro alimentazione.

Inoltre, un consumo eccessivo e prolungato di nitriti è associato ad un aumento del rischio di tumori allo stomaco e all'esofago.

Infine, per prevenire il *C. botulinum* si possono utilizzare batteri lattici, che rappresentano degli ottimi antagonisti poiché producono acido lattico, che abbassa il pH e, inoltre, come detto in precedenza, alcuni ceppi possono produrre batteriocine.

In generale, è meglio evitare la preparazione di conserve di carne e pesce fatte in casa.

Questo perché esse non possono essere acidificate o trattate con quantità di sale o zucchero idonee a bloccare lo sviluppo dei clostridi produttori di tossine botuliniche. La sicurezza di questi prodotti è garantita solo attraverso la distruzione di tutte le spore eventualmente presenti, applicando il processo termico di sterilizzazione, a 121°C.

Recentemente, sono stati messi in commercio degli strumenti (“canners”) che permettono di effettuare questo trattamento anche in casa.

Altri trattamenti ritenuti validi per prevenire e contrastare lo sviluppo del microrganismo possono essere:

- l'utilizzo di disinfettanti (ad esempio il cloro in 5-10 minuti inattiva le spore di *C. botulinum* A, B ed E).
- l'impiego di alte pressioni ma, solamente, se combinate con un trattamento termico adeguato; infatti, le spore di questo microrganismo sono molto resistenti alle alte pressioni.

Una volta contratta la patologia, i trattamenti possibili sui quali si basa la terapia sono la terapia di supporto e l'assunzione dell'antitossina.

La terapia di supporto consiste nella nutrizione parenterale e nella ventilazione meccanica.

La terapia specifica, invece, è costituita dalla somministrazione dell'antitossina botulinica, che può essere trivalente (A, B ed E), bivalente (solo tipo A e B) e l'antitossina E.

L'antitossina deve essere assunta preferibilmente entro 24h dalla comparsa dei sintomi; la terapia antibiotica, invece, non ha effetti diretti sulla tossina botulinica

5.0 MONITORAGGIO DI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI

Nonostante l'applicazione di nuove misure di controllo e prevenzione nell'ambito della filiera alimentare (utilizzo dell'HACCP¹), l'incidenza della patologia causata dalla presenza di *C. botulinum*, come di altri patogeni alimentari, tende a rimanere elevata.

¹ HACCP: insieme di procedure mirate a garantire la salubrità degli alimenti

Per questo è importante monitorare e controllare lo sviluppo dei microrganismi, per riuscire a tenerli sotto controllo.

Non esiste un metodo standardizzato per l'isolamento del *C. botulinum* negli alimenti. L'analisi è basata esclusivamente sulla ricerca della tossina attraverso test in vivo, test enzimatici, test ELISA e sulla caratterizzazione della forma batterica mediante terreni di coltura. Infine, si ricercano i geni codificanti per la produzione della neurotossina botulinica.

Recentemente sono stati sviluppati nuovi metodi di monitoraggio rapido dei microrganismi in grado di dare, nei tempi più brevi possibili, informazioni sulla diffusione del microrganismo e sull'origine della contaminazione.

Per monitorare i microrganismi negli alimenti, esistono diversi approcci analitici, tra cui i principali sono:

- Analisi microbiologiche classiche: coltivazione in piastra o con most probable number (MPN).
- Analisi metaboliche-fisiologiche (test enzimatici), nei quali l'obiettivo è rilevare una qualsiasi attività in atto.
- Analisi sierologiche-immunoenzimatiche: in questo caso viene sfruttata l'interazione antigene-anticorpo.
- Analisi genetiche (molecolari): sono quelle introdotte più recentemente e si basano sull'analisi dell'acido nucleico; la più diffusa è la PCR. Essa è molto importante per il nostro studio riguardo il *C. botulinum*, in quanto è con questa analisi che si riescono ad identificare i geni codificanti la tossina botulinica.

Per la coltivazione dei microbi in laboratorio, è necessario creare un ambiente artificiale simile a quello in cui normalmente esso cresce, in modo da favorire il suo sviluppo. Tuttavia, i microrganismi possono essere coltivabili o non coltivabili (in questo caso sono chiamati VBNC¹); quest'ultima condizione può essere indotta a causa di situazioni di stress ambientale, come l'aumento della temperatura o la mancanza di nutrienti. In questo caso il microrganismo, pur avendo il metabolismo attivo, non è in grado di riprodursi.

¹ VBNC: vitale ma non coltivabile

5.1 TERRENI DI COLTURA

Le analisi microbiologiche classiche vengono fatte per trovare microbi vivi e vitali su piastre petri oppure su mezzi liquidi.

I terreni utilizzati possono essere:

- Liquidi: come la tecnica MPN. In questo caso non si conta il numero di colonie, ma si osserva la torbidità.
- Solidi: nei quali, invece, viene contato il numero di colonie.

In questo secondo caso ci sono due modalità di semina:

- Semina per inclusione: viene utilizzata per i batteri anaerobi (come *C. botulinum*) e la quantità di campione inoculata è di 1 ml; una volta versato il campione sulla piastra, viene messo il mezzo di crescita e viene lasciato solidificare.
- Spatolamento superficiale: utilizzato, invece, per i batteri aerobi, in quanto viene versato prima il mezzo di crescita e, una volta solidificato, si semina il campione. La quantità di campione, in questo caso, è 0,1 ml perché deve essere assorbito dal mezzo.

Il most probable number, invece, è una procedura utilizzata per stimare la densità di una popolazione batterica in un determinato campione. In questo caso la carica microbica viene rilevata basandosi sulla crescita in un mezzo liquido.

Come detto in precedenza, per valutare lo sviluppo microbico non si vanno a contare le colonie, ma si osserva l'intorbidimento della coltura, l'acidificazione del mezzo e le attività metaboliche dei batteri (ad esempio la produzione di gas).

L'ultima distinzione importante riguardo i terreni di cultura risulta essere quella tra terreni selettivi e terreni differenziali.

I primi sono terreni che consentono lo sviluppo di solo una certa parte di microrganismi (nel caso, ad esempio, del *C. botulinum*, il terreno verrà reso anaerobio, in modo da permettere solo a tali microrganismi di svilupparsi).

Un terreno può essere reso selettivo attraverso l'aggiunta di qualcosa che inibisca lo sviluppo di una determinata categoria di microrganismi oppure attraverso l'eliminazione di elementi essenziali per un'altra.

I terreni differenziali, invece, sono terreni nei quali crescono diversi microrganismi, distinguibili l'uno dall'altro per delle caratteristiche visibili (produzione di gas, colorazione nera, cambio di colorazione), che possono essere associate ad una determinata categoria.

5.2 DIAGNOSI IN LABORATORIO

Non tutti i microrganismi possono essere studiati in tutti i laboratori. La normativa, in base alla pericolosità del microbo, prevede delle strutture necessarie per la loro manipolazione. Il testo unico sulla Sicurezza sul lavoro Dlgs n.81 del 2008 divide i microrganismi in 4 categorie, in base alla pericolosità.

In questo caso, il microrganismo di nostro interesse è il *C. botulinum*, che fa parte del gruppo 2, ovvero tutti i microrganismi che possono causare malattie in soggetti umani e che possono essere potenzialmente patogeni.

Per analizzare questo microrganismo in laboratorio si effettua l'isolamento della tossina botulinica nei campioni biologici come il siero, il contenuto gastrico, le feci, oppure nei residui alimentari consumati dai soggetti che presentano una sintomatologia caratteristica.

Tuttavia, le tossine botuliniche rimangono in circolo nel sangue solo per pochi giorni, dopo di che verranno metabolizzate; perciò, la loro determinazione nei campioni biologici non è sempre possibile. Questo avviene anche nei residui alimentari dove, invece, possono subire denaturazione¹ ad opera di proteasi batteriche.

Analizzando campioni alimentari bisogna prestare molta attenzione poiché, essendo il *C. botulinum* un microrganismo ubiquitario, c'è la probabilità che esso abbia contaminato conserve alimentari e le materie prime utilizzate per realizzarle.

Tale rischio, si può escludere solo nel caso in cui le conserve alimentari presentino caratteristiche chimico-fisiche non compatibili con lo sviluppo di tale microrganismo. Per questo motivo, quando il campione arriva in laboratorio, la prima cosa da analizzare sono proprio queste caratteristiche proprie

¹ Denaturazione: perdita della struttura terziaria

dell'alimento, in quanto costituiscono la via principale di controllo di questo microrganismo.

L'analisi dei residui alimentari è molto utile, soprattutto al fine di evitare o limitare l'insorgenza di altri casi derivanti dallo stesso prodotto.

I prodotti alimentari, sia di produzione industriale che di produzione domestica, devono essere preferibilmente inviati al laboratorio nelle loro confezioni originali. Nel caso in cui le confezioni siano di grandi dimensioni è opportuno, quando possibile, prelevare almeno 250 g del contenuto (se il prodotto contiene due fasi prelevare sia la parte liquida che la parte solida); è tuttavia possibile analizzare anche quantitativi minimi (< 1 g). Talvolta si può ricorrere anche all'analisi di barattoli o contenitori vuoti, purché non siano stati lavati in lavastoviglie o con detersivi. Se durante l'indagine epidemiologica si dovessero riscontrare preparazioni gemelle (anche di altro lotto) a quelle consumate dal malato, anch'esse dovrebbero essere campionate ed inviate al laboratorio. (*Ministero della Salute, 2017*)

Il rischio principale per il personale di laboratorio dipende dalla tossina botulinica e dal suo assorbimento per via cutanea o intestinale. Per questo è importante che la raccolta, il trasporto e l'analisi dei campioni vengano effettuati nella maniera adeguata e seguendo tutte le procedure di sicurezza (utilizzo di guanti, del camice, occhiali di protezione).

Per quanto riguarda la determinazione della tossina botulinica, l'analisi dura circa 4 giorni e si basa sulla prova biologica del topo (mouse bioassay).

Tale metodo, tuttavia, seppur molto sensibile e specifico grazie all'uso di antisieri per i singoli sierotipi, prevede il sacrificio di numerosi animali e richiede tempi troppo elevati per la conferma di un esito negativo. Per tali motivi si stanno cercando metodi alternativi che non prevedano l'uso di animali da laboratorio.

Un esempio di alternativa valida, come già accennato, sono quelli di biologia molecolare soprattutto grazie alla loro rapidità rispetto ai metodi convenzionali.

5.3 METODI INNOVATIVI DI RICERCA

Sono stati descritti diversi metodi PCR per il rilevamento dei clostridi produttori di tossine botuliniche negli alimenti e nei campioni clinici. I risultati ottenuti

utilizzando questi test per rilevare i frammenti del gene della neurotossina hanno mostrato un alto livello di concordanza con quelli del test biologico sui topi.

Sono stati condotti diversi studi, ma i test risultati più validi ed utilizzati sono stati quelli basati sulla real-time PCR o PCR quantitativa.

La PCR (polymerase chain reaction) è una tecnica di biologia molecolare che ha lo scopo di amplificare in modo rilevante uno specifico frammento di DNA di un campione, attraverso l'azione di un enzima, la polimerasi.

Essa è un'analisi di tipo qualitativo, perciò non fornisce informazioni sulla quantità dei microrganismi presenti, ma solo sulla loro presenza o assenza. Inoltre, questa tecnica non permette di rilevare lo stato fisiologico del microbo e questo è da tenere in considerazione nel momento in cui, ad esempio, viene fatta l'analisi in seguito ad un trattamento termico.

La PCR è una reazione enzimatica che richiede strumenti come un termociclatore, nel quale avviene la reazione e reagenti, quali il campione contenente il DNA, un enzima (DNA polimerasi) e dei nucleotidi e primer specifici. Questa analisi si basa su un ciclo termico, costituito da tre fasi alle rispettive temperature:

- Denaturazione del DNA (92-98°C)
- Appaiamento del DNA, che tende a chiudersi ma, con l'innescò dei primer viene bloccato; la polimerasi si aggancia al DNA e inizia la duplicazione in direzione 5' → 3' (50-60°C)
- 70°C che costituisce la temperatura ottimale per la polimerasi

Ad ogni ciclo, della durata di 3-4 minuti, si ottengono 1 o 2 copie, fino ad arrivare al 30° ciclo, in cui si avranno 10⁹ copie del gene.

La real-time PCR, invece, funziona in maniera leggermente diversa: viene monitorata la quantità di DNA direttamente nello strumento con un sistema di rilevazione a fluorescenza.

Nella PCR in tempo reale il DNA viene misurato man mano che la reazione procede, con la quantificazione del prodotto alla fine di ogni ciclo.

Il principale vantaggio di questo metodo è che permette la determinazione del numero di microrganismi presenti in campioni alimentari potenzialmente

contaminati, perciò rende la PCR un'analisi, oltre che qualitativa, anche quantitativa.

La PCR-RT richiede l'utilizzo di due sistemi di rilevamento: l'utilizzo di coloranti che si legano ai doppi filamenti di DNA oppure delle sonde specifiche legate a molecole fluorescenti.

Recentemente, questa metodica viene applicata sempre più spesso per rilevare microrganismi patogeni in diversi campioni.

Tuttavia, dagli studi effettuati, si è visto anche uno dei principali svantaggi della maggior parte dei metodi basati sulla PCR per la rilevazione dei geni produttori di tossine botuliniche: l'assenza di un controllo di amplificazione interno (IAC).

Se esso fosse presente, infatti, eviterebbe dei risultati falsi negativi a causa dell'inibizione dell'enzima polimerasi o al mal funzionamento del termociclatore.

A causa di questa mancanza i risultati indicano spesso che l'analisi deve essere ripetuta, ad esempio, utilizzando nuovi reagenti o un metodo alternativo di estrazione e purificazione del DNA.

Recentemente, però, la pubblicazione della norma ISO 22174 ha reso obbligatoria l'inclusione di una IAC in qualsiasi standard internazionale che utilizzi metodi basati sulla PCR per rilevare microrganismi patogeni negli alimenti.

Da questi studi, si è compreso come le due tecniche di PCR (quella convenzionale e quella in tempo reale) siano altamente correlate e, per questo, si potrebbero facilmente introdurre le apparecchiature utilizzate per la PCR in tempo reale nei laboratori; in questo modo si dimezzerebbero i tempi, non dovendo più utilizzare l'elettroforesi.

Negli ultimi anni si stanno cercando di sviluppare sempre nuovi metodi da utilizzare in laboratorio.

Uno dei più recenti sviluppati è stato l'EndoPep-MS abbinato alla purificazione degli anticorpi e all'arricchimento delle tossine ed 'è stato applicato con successo a vari tipi di campioni.

Questo metodo è stato sviluppato negli anni 2000 dai ricercatori del Centre for Disease Control and Prevention di Atlanta e consiste in un'analisi di spettrometria di massa per la rilevazione della presenza della tossina attiva in diverse tipologie di campioni. Grazie a questo metodo è, quindi, possibile, non solo valutare la

presenza delle tossine, ma anche misurare la loro attività in modo altamente sensibile e specifico. (Barr et al., 2005; Drigo et al., 2020; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2016)

La presenza della tossina nel campione è rivelata grazie alla visualizzazione grafica dei frammenti peptidici, che vengono registrati dallo strumento come picchi.

Inizialmente, questa procedura era stata sviluppata utilizzando una strumentazione molto costosa e utilizzabile solamente dal personale specializzato. Tuttavia, si è dimostrato recentemente che è possibile applicare tale metodo anche in laboratori di microbiologia clinica, utilizzando strumenti più diffusi come gli spettrometri di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption- Time of Flight), i più utilizzati in diagnostica microbiologica clinica. Come tutti gli spettrometri di massa è formato da una componente detta “sorgente” (MALDI) e da un analizzatore di massa (TOF).

Questo strumento sta subendo una rapida diffusione, dovuta alla sua versatilità, velocità nei tempi di analisi, costi bassi e facilità di utilizzo.

Per tutti questi motivi, si può constatare la superiorità di questo metodo rispetto ai metodi diagnostici convenzionali.

Infatti, dopo tutte le analisi fatte, si è dimostrato che esso possiede una sensibilità del 100% e una specificità del 96,08%.

In uno studio effettuato del 2021 da Irshad M Sulaiman, Nancy Miranda, Steven Simpson si è vista l'applicazione della spettrometria di massa MALDI-TOF per l'identificazione rapida di isolati simili a *Clostridium* in matrici alimentari.

La MS a tempo di volo con desorbimento e ionizzazione laser assistita da matrice (MALDI-TOF) utilizza cellule batteriche intatte e non richiede alcuna fase relativa all'isolamento e alla purificazione del DNA; per questo motivo è emersa come un dispositivo promettente per il rilevamento e l'identificazione rapidi di batteri patogeni.

In questo studio sono stati prelevati vari campioni di alimenti e integratori alimentari per l'infanzia e poi analizzati 33 diversi isolati batterici.

Per l'analisi MALDI-TOF gli isolati sono stati coltivati su un terreno di placcatura di agar sangue Columbia (Remel, San Diego, CA) e incubati a circa 37°C per 48

ore. Questa analisi è stata eseguita su un sistema VITEK MS, utilizzato per l'identificazione della specie (bioMérieux Inc.).

Irshad M Sulaiman, Nancy Miranda e Steven Simpson, per confermare i dati di identificazione della specie ottenuti, hanno eseguito l'analisi della sequenza del DNA della regione del gene 16S rRNA e li hanno poi confrontati, come si vede in Figura 1.

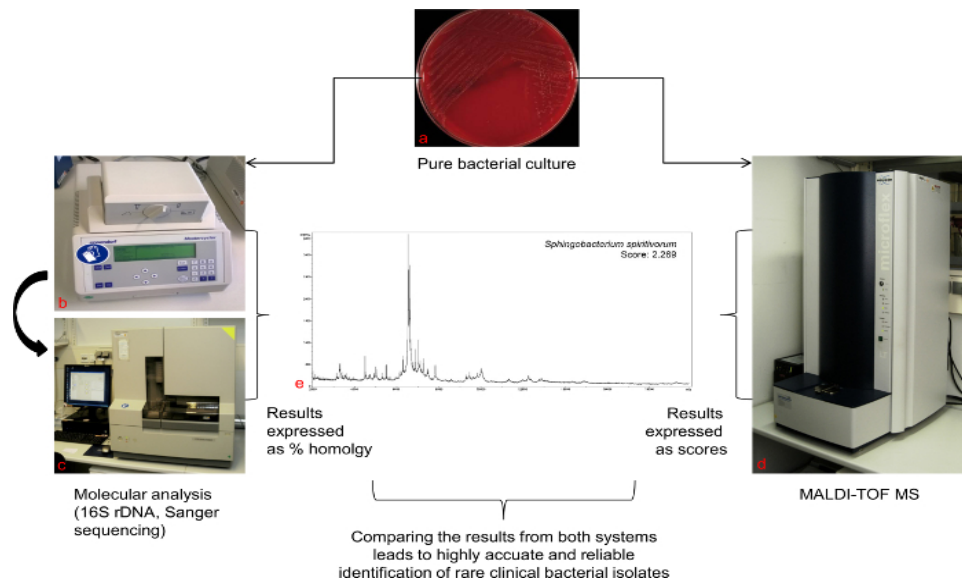


Figura 1. Confronto tra identificazione di batteri patogeni da 16S rRNA sequenziamento del gene e MALDI-TOF MS.

Il gene 16S rRNA è il componente strutturale centrale di batteri e archaea e codifica le piccole molecole di RNA ribosomiale della subunità dei ribosomi; perciò, è essenziale per l'inizio della sintesi proteica. Per questo è stato ampiamente utilizzato nello sviluppo di metodi diagnostici.

I risultati ottenuti dalle precedenti analisi si possono osservare in Tabella 1.

I punteggi superiori al 90% di probabilità indicavano un eccellente valore di discriminazione e un'identificazione affidabile; punteggi inferiori al 60% rappresentavano una bassa discriminazione.

Dove, invece, troviamo la dicitura "Organismo non identificato", è perché non è stata trovata nessuna corrispondenza per gli spettri compositi o quando non sono stati generati picchi spettrali durante l'analisi.

La regione del gene 16S rRNA è stata amplificata con PCR e poi analizzata tramite elettroforesi su gel di agarosio.

TABELLA 1. Identificazione delle specie di isolati simili a *Clostridium* mediante MALDI-TOF MS e analisi di sequenziamento dell'rRNA.

S. No.	Isolato	Origine	VITEK 2 ID, % di probabilità	VITEK MS ID		Sequenziamento dell'rRNA 16S			
				Specie identificate	Valore di fiducia, %	Gene sequenziato, bp	Specie identificate	Variazione della sequenza, % di somiglianza	Riferimento
1	S-02	Cibo	<i>Clostridium perfringens</i> (97%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (695)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
2	S-14	Cibo	<i>Clostridium difficile</i> (99%)	<i>Clostridium difficile</i>	>99%	rRNA 16S (699)	<i>Clostridium difficile</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN080438
3	S-27	Cibo	<i>Clostridium difficile</i> (99%)	<i>Clostridium difficile</i>	>99%	rRNA 16S (650)	<i>Clostridium difficile</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN080438
4	S-32	Cibo	<i>Clostridium clostridioforme</i> (96%)	<i>Clostridium butyricum</i>	>99%	rRNA 16S (697)	<i>Clostridium butyricum</i>	Identico (100%)	Questo studio, MK571204
5	S-33	Cibo	<i>Clostridium bifermentans</i> (98%)	<i>Clostridium butyricum</i>	>99%	rRNA 16S (697)	<i>Clostridium butyricum</i>	Identico (100%)	Questo studio, MK571204
6	S-34	Cibo	Organismo non identificato	Nessun documento d'identità	— c	rRNA 16S (695)	<i>Clostridium aciditolerans</i>	Identico (100%)	Questo studio, NR_043557
7	S-35	Cibo	<i>Clostridium ramosum</i> (85%)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	>99%	rRNA 16S (664)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Identico (100%)	Questo studio, CP011966
8	S-36	Cibo	<i>Citrobacter amalonaticus</i> (96%)	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	>99%	rRNA 16S (698)	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN400093
9	S-37	Cibo	<i>Clostridium sporogenes</i> (97%)	<i>Clostridium sporogenes</i>	>99%	rRNA 16S (699)	<i>Clostridium sporogenes</i>	Identico (100%)	Questo studio, MK341728

10	S-38	Cibo	<i>Clostridium bifermentans</i> (98%)	<i>Clostridium bifermentans</i>	>99%	rRNA 16S (699)	<i>Clostridium bifermentans</i>	Identico (100%)	Questo studio, KT367517
11	S-39	Cibo	Organismo non identificato	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	>99%	rRNA 16S (696)	<i>Clostridium subterminale</i>	Identico (100%)	Questo studio, AF241842
12	S-40	Cibo	<i>Clostridium bifermentans</i> (98%)	<i>Clostridium bifermentans</i>	>99%	rRNA 16S (699)	<i>Clostridium bifermentans</i>	Identico (100%)	Questo studio, KT367517
13	S-41	S-41	Organismo non identificato	Nessun documento d'identità	—	rRNA 16S (694)	<i>Clostridium cochlearium</i>	Identico (100%)	Questo studio, NR_113026
14	S-42	Cibo	<i>Clostridium sporogenes</i> (98%)	<i>Clostridium sporogenes</i>	>99%	rRNA 16S (699)	<i>Clostridium sporogenes</i>	Identico (100%)	Questo studio, MK341728
15	S-44	Cibo	<i>Clostridium bifermentans</i> (98%)	<i>Clostridium bifermentans</i>	>99%	rRNA 16S (699)	<i>Clostridium bifermentans</i>	Identico (100%)	Questo studio, KT367517
16	S-48	Cibo	<i>Clostridium perfringens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
17	S-49	Cibo	<i>Clostridium sporogenes</i> (98%)	<i>Clostridium sporogenes</i>	>99%	rRNA 16S (666)	<i>Clostridium sporogenes</i>	Identico (100%)	Questo studio, MK341728
18	S-50	Cibo	<i>Clostridium perfringens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
19	S-55	Cibo	<i>Clostridium perfringens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
20	S-56	Cibo	<i>Clostridium subterminale</i> (98%)	<i>Clostridium subterminale</i>	>99%	rRNA 16S (646)	<i>Clostridium subterminale</i>	Identico (100%)	Questo studio, AF241842
21	S-61	Cibo	<i>Clostridium perfringens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666

22	S-62	Cibo	<i>Clostridium perfrangens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
23	S-63	Cibo	<i>Clostridium perfrangens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
24	S-65	Cibo	<i>Clostridium perfrangens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
25	S-66	Cibo	Organismo non identificato	Nessun documento d'identità	—	rRNA 16S (651)	<i>Clostridium subterminale</i>	Identico (100%)	Questo studio, MG543819
26	S-68	Cibo	<i>Clostridium perfrangens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
27	S-70	Cibo	<i>Clostridium perfrangens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
28	S-71	Cibo	<i>Clostridium perfrangens</i> (98%)	<i>Clostridium perfringens</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium perfringens</i>	Identico (100%)	Questo studio, MN326666
29	S-72	Cibo	<i>Clostridium clostridioforme</i> (96%)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Identico (100%)	Questo studio, MK606062
30	S-73	Cibo	<i>Clostridium clostridioforme</i> (96%)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Identico (100%)	Questo studio, MK606062
31	S-74	Cibo	<i>Clostridium subterminale</i> (98%)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	>99%	rRNA 16S (669)	<i>Clostridium beijerinckii</i>	Identico (100%)	Questo studio, MK606062
32	S-75	Cibo	Organismo non identificato	Nessun documento d'identità	—	rRNA 16S (660)	<i>Clostridium aerotolerans</i>	Identico (100%)	Questo studio, AB610574
33	S-76	Cibo	Organismo non identificato	Nessun documento d'identità	—	rRNA 16S (672)	<i>Clostridium argentine nse</i>	Identico (100%)	Questo studio, MF988717

Come si vede in tabella, il sistema VITEK 2 è riuscito a identificare la maggior parte dei batteri gram positivi (28 su 33).

Il sistema VITEK MS per l'identificazione delle specie si è dimostrato molto attendibile, con un valore di fiducia del 99,9 %.

Questo studio ha come scopo principale quello di valutare e sviluppare metodi diagnostici rapidi che possano essere applicati in microbiologia alimentare per un'identificazione rapida di *Clostridium spp.* isolati dagli alimenti.

MALDI-TOF MS è una tecnologia emergente che è stata ampiamente utilizzata per esaminare gli isolati clinici per l'identificazione in tutto il mondo (Ho TY, Chiang-Ni C., Teng SH, 2019) e negli ultimi anni, viene applicato sempre di più per analizzare i microrganismi in campioni alimentari.

Per l'identificazione delle specie vengono utilizzate le proteine e i lipidi della cellula batterica intatta di un organismo. I dati di identificazione delle specie prodotti dai sistemi MALDI-TOF MS si sono rivelati riproducibili e applicati nel rilevamento e nella differenziazione degli isolati batterici sia a livello di genere che di specie (Anhalt JP, Fenselau C. 1975).

Esistono attualmente due spettrometri di massa MALDI-TOF (VITEK MS e Bruker Biotyper) e, da diversi studi effettuati, si è concluso che i due modelli si possono ritenere quasi equivalenti nel fornire l'identificazione microbica (Hsieh YH, Wang YF, Moura, H., Miranda, N., Simpson, S., Gowrishankar, R., Barr, J., Kerdahi K., Sulaiman, 2018).

In particolare, in uno studio, queste due piattaforme MALDI-TOF MS, sono state confrontate con i dati di sequenziamento dell'rRNA 16S per l'identificazione della specie *Clostridium*.

I risultati sono stati i seguenti:

- il sequenziamento dell'rRNA 16S ha identificato 10 specie diverse per i 52 isolati
- il sistema VITEK MS ha identificato 47 dei 52 isolati
- Bruker Biotyper ha identificato tutti i 52 isolati

Il Bruker, perciò, è risultato l'unico a fornire una discriminazione precisa del 100%.

Nello studio di Irshad M Sulaiman, Nancy Miranda e Steven Simpson il sistema VITEK MS ha identificato 28 dei 33 isolati simili a *Clostridium* e i dati generati dal

VITEK MS corrispondevano completamente ai dati ottenuti dal sequenziamento dell'rRNA 16S per gli isolati esaminati.

Questo studio ha perciò dimostrato come il sistema VITEK MS e la tecnologia MALDI-TOF MS risultino essere strumenti semplici, veloci e, soprattutto, riproducibili nelle nostre condizioni di laboratorio, in grado di fornire un'identificazione accurata e rapida a livello di specie dei Clostridium patogeni per l'uomo.

CONCLUSIONE

Il *Clostridium botulinum* è un patogeno molto serio, che causa la patologia del botulismo, determinata dalla produzione di tossine e che può determinare conseguenze molto gravi, fino a portare alla paralisi. La tossina botulinica, come già detto nell'elaborato, rappresenta uno dei veleni più pericolosi al mondo, infatti, con solo 0,1-1 µg si può morire; per questo non è un pericolo da sottovalutare.

Essa può risultare ancora più pericolosa quando colpisce neonati con un'età inferiore all'anno, che rappresentano soggetti più a rischio, in quanto la loro flora intestinale è ancora immatura e potrebbe non essere in grado di contrastare lo sviluppo delle spore.

Ciò che è essenziale per prevenire l'insorgenza della patologia è conoscere gli alimenti più a rischio.

Essi risultano essere quelli a maggior contatto con il suolo e, in particolare, le conserve. Per quanto riguarda il botulismo infantile, invece, l'alimento responsabile dell'insorgenza della malattia è il miele.

Tuttavia, la causa maggiore della contaminazione degli alimenti è la conoscenza non adeguata, da parte del consumatore, delle buone pratiche di preparazione e conservazione degli alimenti.

Bisogna effettuare un corretto trattamento termico, infatti è necessaria una sterilizzazione a 121°C per poter uccidere il microrganismo. Per quanto riguarda, invece, la conservazione degli alimenti, è essenziale mantenere la catena del freddo, per non causare la germinazione delle spore di *C. botulinum* e la conseguente produzione della tossina.

Risulta, perciò, fondamentale investire sulla formazione della popolazione riguardo l'argomento, in quanto questa patologia è ancora poco conosciuta.

Oltre alla prevenzione, abbiamo visto i metodi di monitoraggio del microrganismo negli alimenti.

Il metodo convenzionale, seppur efficace, non è condiviso da molti poiché utilizza animali vivi.

Per questo sono stati sviluppati nuovi metodi, come la Real-Time PCR e l'Endo-Pep MS che, come abbiamo potuto constatare, portano ad un risultato equiparabile ai test biologici, se non migliore.

Tuttavia, il sistema VITEK MS, basato sulla tecnologia MALDI-TOF, come visto nello studio riportato, è risultato il miglior metodo per l'identificazione di clostridi patogeni per l'uomo, con un'attendibilità maggiore del 99%.

Siccome tali procedure possono facilmente essere eseguite in un laboratorio di microbiologia senza la necessità di personale particolarmente specializzato, si può giungere alla conclusione che in futuro esse sostituiranno completamente i test sugli animali.

Con le nuove tecnologie si potrebbe, inoltre, estendere queste metodiche anche alla ricerca di altre tossine.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Drigo, I., Tonon, E., Pascoletti, S., Anniballi, F., Kalb, SR, & Bano, L. (2020). Rilevazione di BoNT/C e D attivi mediante EndoPep-MS utilizzando lo strumento MALDI Biotyper e confronto con il test biologico sui topi. *Tossine* , 13 (1), 10. <https://doi.org/10.3390/toxins13010010>
- [2] Pasolini B., Ferrini A.M., Prove biotossicologiche per il rilevamento della tossina botulinica, Istituto Superiore di Sanità, 215-227.
- [3] Fenicia L, Anniballi F, De Medici D, Delibato E, Aureli P. SYBR green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. *Appl Environ Microbiol.* 2007 May;73(9):2891-6. doi: 10.1128/AEM.02234-06. Epub 2007 Mar 16. PMID: 17369349; PMCID: PMC1892887.
- [4] (Aureli, P., Di Cunto, M., Maffei, A., De Chiara, G., Franciosa, G., Accorinti, L., ... & Greco, D. (2000). An outbreak in Italy of botulism associated with a dessert made with mascarpone cream cheese. *European journal of epidemiology*, 16, 913-918).
- [5] (Woodruff, B. A., Griffin, P. M., McCroskey, L. M., Smart, J. F., Wainwright, R. B., Bryant, R. G., ... & Hatheway, C. L. (1992). Clinical and laboratory comparison of botulism from toxin types A, B, and E in the United States, 1975–1988. *Journal of Infectious Diseases*, 166(6), 1281-1286.)
- [6] Griglio, B., Galvagno, G., Sattanino, G., Rossignoli, M., & Musella, C. (2004). Il botulismo infantile: il ruolo del miele. *AIVEMP Newsletter*.
- [7] Lonati, D., Locatelli, C., Bigi, S., Vecchio, S., Petrolini, V., Giampreti, A., ... & Manzo, L. Il botulismo infantile: un network per migliorare la diagnosi e il trattamento di una malattia rara e sotto-diagnosticata.
- [8] BISINELLA, S. Il botulismo infantile derivante dalla consumo di miele ei suoi metodi di prevenzione.

[9] Comi, G., Iacumin, L., Giusto, C., & Manzano, M. (2006). Pericoli microbiologici e modalità attuabili per il loro controllo negli alimenti. In *IV Convegno AISSA: "Qualità e sostenibilità delle produzioni agrarie, alimentari e forestali"* (pp. 23-23). AV.

[10] Vairo, F., Pittalis, S., Paglia, M. G., Lauria, F. N., & Ippolito, G. BOTULISMO.

[11] Macrì, A., & Aureli, P. (2005). La sicurezza degli alimenti nella filiera produttiva. *La sicurezza degli alimenti nella filiera produttiva*, 1000-1017.

[12] Volpe, G., Delibato, E., Orefice, L., & Palleschi, G. Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili. *Maggio 2005*.

[13] Assisi, F., Balestreri, S., & Finazzi, G. (2016). Le intossicazioni alimentari da tossine naturali: Guida al riconoscimento e alla prevenzione.

[14] Emilia–Romagna, R. Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari.

[15] Lantibiotici, C. I. (2012). Valutazione dell'attività antibatterica delle batteriocine nei confronti di patogeni alimentari. *Argomenti di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare. Seminari dipartimentali 2011, 12, 28*.

[16] Linee Guida per la corretta preparazione delle conserve alimentari in ambito domestico - Istituto Superiore di Sanità - Centro Nazionale di riferimento per il Botulismo, 2014.

[17] Istituto Superiore di Sanità - Centro Nazionale di riferimento per il Botulismo, igiene della produzione, trasformazione, commercializzazione, conservazione e trasporto alimenti di origine animale, *Clostridium botulinum*, 2014.

www.ausl.vda.it

[18] Fenicia, L., & Anniballi, F. (2009). Botulismo infantile. *Ann Ist Super Sanità* , 45 (2), 134-46.

[19] Istituto superiore di sanità (2022), Botulismo alimentare.

[20] DI, N. P. (2014). Presenza di *Clostridium botulinum* nei processi di digestione anaerobica.

[21] Bradley A. Woodruff, Patricia M. Griffin, Loretta M. McCroskey, Joanne F. Smart, Robert B. Wainwright, Raymond G. Bryant, Lori C. Hutwagner, Charles L. Hatheway, Confronto clinico e di laboratorio del botulismo dalle tossine di tipo A , B ed E negli Stati Uniti, 1975–1988, *The Journal of Infectious Diseases* , volume 166, numero 6, dicembre 1992.

<https://doi.org/10.1093/infdis/166.6.1281>

[22] Fabio Fanti (2019) *Biologia, microbiologia e tecnologie di controllo sanitario*.

[23] MARCOLIN, M. Validazione del metodo EndoPep-MS come tecnica diagnostica per il rilevamento delle tossine botuliniche attive.

[24] Irshad M Sulaiman, Nancy Miranda, Steven Simpson, Spettrometria di massa MALDI-TOF e analisi della sequenza genica 16S rRNA per l'identificazione di *Clostridium* Spp di origine alimentare, *Journal of AOAC INTERNATIONAL* , Volume 104, Numero 5, settembre-ottobre 2021, pagine 1381–1388.

<https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab070>

[25] Schröttner, P., Gunzer, F., Schüppel, J., Rudolph, WW Identificazione di agenti patogeni batterici rari mediante sequenziamento del gene 16S rRNA e MALDI-TOF MS. *J.Vis. Esp.* (113), 2016.