

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>p. 1</b>
<b>CAP. 1 - MALATTIE ALIMENTARI E BATTERI</b>	
<i>Alberto Zancanaro</i>	
1.1 Generalità sull'Igiene Alimentare	p. 2
1.2 Trasmissione dei batteri dagli alimenti all'uomo	p. 8
1.3 Colonizzazione microbica delle superfici e formazione di <i>biofilm</i>	p. 13
1.4 Batteri presenti negli alimenti	p. 18
<b>CAP. 2 – <i>CAMPYLOBACTER</i></b>	<b>p. 26</b>
<i>Alberto Zancanaro</i>	
2.1 Patologie indotte da <i>Campylobacter spp.</i>	p. 29
2.2 Tecniche colturali	p. 37
2.3 <i>Campylobacter jejuni</i>	p. 38
2.4 Trattamenti per eliminare <i>Campylobacter</i> e altri batteri dagli alimenti	p. 43
<b>CAP.3 - SINDROME DI GUILLAIN-BARRÈ</b>	
<i>Enrico Fabrin, Alberto Zancanaro</i>	<b>p. 61</b>
3.1 Classificazione delle neuropatie	p. 65
3.2 Forme con similari della GBS	p. 72
3.3 Sintomatologia	p. 87
3.4 Epidemiologia	p. 90
3.5 Patologia e patogenesi	p. 98
3.6 Diagnosi	p.104
3.7 Prognosi e terapia	p.111
3.8 Impatto economico	p.118

## **CAP. 4 – LEGISLAZIONE**

**4.1** Legislazione riguardante i microrganismi presenti negli alimenti  
*Alberto Zancanaro* p.124

**4.2** Legislazione riguardante le malattie rare  
*Enrico Fabrin* p.131

**CONCLUSIONE** p.140

**APPENDICI** Il sistema immunitario – *Enrico Fabrin* p.142

Il sistema nervoso – *Enrico Fabrin* p.168

**ALLEGATO** Fondazioni e/o associazioni che si occupano di GBS  
*Alberto Zancanaro* p.176

**BIBLIOGRAFIA** p.178

# INTRODUZIONE

Durante i tre anni del Corso di Laurea in Sicurezza Igienico-Sanitaria degli Alimenti abbiamo studiato materie come Chimica, Patologia e Microbiologia, che ci hanno permesso di conoscere le Malattie Alimentari. In questa tesi di laurea abbiamo approfondito la conoscenza di una tra le numerose malattie rare che possono avere origine alimentare, la sindrome di Guillain-Barrè, che a livello mondiale ha un'incidenza di 0,6-4 casi ogni 100.000 persone. Scoperta durante la Prima Guerra Mondiale da tre giovani medici francesi specializzandi in neurologia, George Charles Guillain, Jean Alexandre Barrè e Andrè Strohl, sembrava insorgere senza un'apparente causa. Da allora si sono susseguiti numerosi studi che hanno chiarito, anche se ancora non del tutto, le cause probabili di questa sindrome, tra cui infezioni del soggetto colpito antecedenti lo svilupparsi della malattia da parte *Campylobacter jejuni*, vari tipi di vaccinazioni (anti-papilloma virus, anti-meningococco, anti-influenza suina), e traumi chirurgici post-operatori. La sindrome di Guillain-Barrè si manifesta con un'iniziale difficoltà di movimento articolare, sviluppandosi in seguito come una vera e propria paralisi totale, con il paziente impossibilitato a muoversi e a svolgere le più semplici azioni, come parlare o aprire gli occhi: in questa sindrome, infatti, si ha un attacco del sistema immunitario all'organismo stesso (patologia autoimmunitaria), provocando la distruzione della mielina che riveste l'assone dei nervi del sistema nervoso periferico. Nella tesi approfondiremo, oltre alle malattie alimentari, l'impatto economico della sindrome, nozioni sul *Campylobacter*, la legislazione riguardante le malattie rare e i batteri degli alimenti, le associazioni che si occupano della GBS, nonché saranno dati e cenni sul sistema nervoso ed immunitario, i principali sistemi colpiti da questa malattia.

# **CAP. 1 - MALATTIE ALIMENTARI E BATTERI**

*Alberto Zancanaro*

## **1.1 - GENERALITÀ SULL'IGIENE ALIMENTARE**

Le scienze che si occupano delle preparazioni alimentari spaziano nei molteplici aspetti della produzione di prodotti destinati all'alimentazione, tra i quali la valutazione delle materie prime, le diverse formulazioni in cui queste ultime possono essere utilizzate e i processi di lavorazione più adeguati affinché le caratteristiche nutrizionali siano alterate il meno possibile. Altri aspetti, non meno importanti, riguardano l'indagine delle esigenze alimentari della popolazione, il controllo della qualità del prodotto in tutte le fasi della produzione, la possibilità di sofisticazioni del prodotto, le metodiche di conservazione, la prevenzione di fenomeni tossici e il conferimento di qualità organolettiche particolari. Poiché la preparazione degli alimenti presenta, aspetti diversi e molto complessi, di essa si occupano discipline differenti, quali chimica, biochimica, microbiologia, fisica e ingegneria. Il problema dell'Igiene Alimentare si è andato sempre più evidenziando nei tempi moderni man mano che i progressi della batteriologia e della chimica ed i moderni metodi di indagini epidemiologiche dimostravano il ruolo sempre più evidente degli alimenti nella eziologia di alcune patologie infettive, tanto da collocare queste ultime all'interno di un ampio gruppo di sindromi denominate "Malattie di origine alimentare" o con termine anglosassone "*food-borne diseases*". Attualmente, esse costituiscono un rilevante problema di salute pubblica non solo nei Paesi sottosviluppati, ma anche nei Paesi ad elevato sviluppo socio-economico. Le malattie di origine alimentare sono trasmesse da cibi o bevande contaminate: infatti diversi microrganismi patogeni possono contaminare gli alimenti e dar luogo a

numerose malattie di origine alimentare alle quali vanno affiancate quelle patologie che possono essere causate da sostanze chimiche tossiche. E' bene ricordare che non tutti i microrganismi presenti nei cibi sono dannosi per l'uomo, né provocano necessariamente il deterioramento degli alimenti. Anzi, alcuni microrganismi che determinano processi di fermentazione, quali batteri, lieviti e muffe, vengono normalmente utilizzati nelle lavorazioni industriali perché conferiscono ai prodotti alcune caratteristiche particolari. Tra questi alimenti possiamo annoverare vino, birra, yoghurt, formaggi, ed in genere cosiddetti prodotti fermentati.

Si possono individuare tre tipi di malattia alimentare di origine microbica:

➤ INTOSSICAZIONI ALIMENTARI: insorgono per consumo di un alimento che contiene una tossina, risultato di uno sviluppo microbico all'interno dell'alimento. Il batterio può anche essere morto, ma la tossina permane (è il caso, ad esempio, dell'intossicazione stafilococcica da *Staphylococcus aureus*, e della gastroenterite da *Bacillus cereus*); incubazione più o meno breve, dai 30 minuti alle 8-12 ore, in media 2-4 ore.

➤ INFEZIONI ALIMENTARI: insorgono quando l'alimento consumato contiene batteri patogeni vivi che colonizzano l'intestino dell'uomo; hanno un incubazione medio-lunga (12-18 ore e fino a 9 giorni; in media 12-24/48 ore), si sviluppano e causano lesioni ai tessuti; sono sufficienti anche cariche infettanti basse 10-1000 UFC/g. In generale, non è necessario che il batterio moltiplichi nell'alimento, ma se ciò accade la probabilità di infezione aumenta (è il caso, ad esempio, della salmonellosi, della shigellosi, della listeriosi e dell'enterite da *Campylobacter spp*).

➤ TOSSINFEZIONI ALIMENTARI: sono una combinazione delle due prime forme. Il microrganismo patogeno deve raggiungere cariche molto elevate nell'alimento (maggiori di  $10^4$  UFC/g) e, dopo l'assunzione da parte dell'uomo, il

batterio continua il suo sviluppo nell'intestino e libera la tossina che scatena la sintomatologia (per esempio, gastroenteriti da *Clostridium perfringens* e ceppi enterotossigeni di *Escherichia coli*); periodo d' Incubazione medio-lungo, da 48/72 ore a 2 mesi, in media 72 ore. [1]

Sebbene in generale la prognosi per tali patologie sia abbastanza favorevole, come dimostrato dai valori di letalità confrontati con quelli della morbilità, va comunque sottolineato che, soprattutto alcune sindromi da patogeni cosiddetti emergenti, possono dar luogo a danni cronici e a disabilità piuttosto gravi. Sono conosciuti oggi al mondo più di 250 agenti di malattia alimentare che si manifestano con differenti sintomi e sono causate da diversi agenti patogeni, per lo più batteri, virus e parassiti. Negli ultimi anni sono stati identificati nuovi patogeni (detti patogeni emergenti, quali *Campylobacter*, alcuni ceppi di *Escherichia Coli* (O157:H7), *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, virus di Norwalk, etc). I fattori che sono alla base dell'aumento delle patologie di origine alimentare possono essere ricondotti essenzialmente a 5 categorie:



cambiamenti demografici e comportamentali;



ampia diffusione delle tecnologie ed industrie del settore;



viaggi internazionali e commercio delle derrate;



selezione di ceppi resistenti;



allevamenti intensivi di animali. [2]

## CAMBIAMENTI DEMOGRAFICI E COMPORTAMENTALI.

I cambiamenti demografici verificatisi nei paesi industrializzati hanno portato ad un aumento della quota di popolazione maggiormente “suscettibile” alle patologie di origine alimentare. L'invecchiamento della popolazione, con conseguente maggiore incidenza di malattie croniche, è sicuramente una delle cause di questa maggiore suscettibilità. Alcuni cambiamenti nelle abitudini alimentari con conseguente maggior consumo di alimenti che potrebbero essere più facilmente contaminati, come le verdure e la frutta fresca non adeguatamente pulite, ed inoltre il consumo di alimenti nell'ambito della ristorazione collettiva sono anche essi cause non secondarie della incidenza di malattie di origine alimentare.

## AMPIA DIFFUSIONE DELLE TECNOLOGIE E DELLE INDUSTRIE DEL SETTORE.

L'espansione dell'industria alimentare ha anch'essa un ruolo importante nella epidemiologia delle patologie alimentari dato che la distribuzione su larga scala di prodotti derivanti da processi industriali centralizzati può avere in sé il rischio di epidemia ad ampia diffusione.

## VIAGGI INTERNAZIONALI E COMMERCIO DELLE DERRATE.

L'aumento vertiginoso dei viaggi internazionali così come il commercio dei prodotti di più diversa origine, anche esotica, non sottoposti a normative stringenti come quelle europee possono anche essere causa dell'aumentata incidenza di malattie di origine alimentare; a riprova di quanto affermato, una sindrome di tipo gastroenterico legata alla ingestione di cibi contaminati viene ormai descritta come “diarrea del viaggiatore”. Gli agenti eziologici più comuni che causano questa

malattia sono ceppi enterotossigeni di *Escherichia Coli* (ETEC) e il virus di Norwalk. La fonte primaria di infezione è l'ingestione di acqua e/o cibi contaminati dalle feci. Le destinazioni a rischio più elevato sono i paesi in via di sviluppo dell'America Latina, dell'Africa, del Medio Oriente e dell'Asia.

#### SELEZIONE DEI CEPPI RESISTENTI.

La selezione di ceppi resistenti agli antimicrobici, compresi alcuni disinfettanti, e la selezione naturale di particolari ceppi sono una causa ulteriore dell'aumentata incidenza di queste patologie.

#### ALLEVAMENTI INTENSIVI DI ANIMALI.

Va infine citata come ultima potenziale causa dell'aumento delle patologie alimentari l'allevamento intensivo di animali per via della enorme produzione di liquami che costituiscono una grande riserva per la diffusione di alcuni germi patogeni, in primo luogo di *Salmonella* e *Campylobacter*. [2]



Microrganismi	Alimenti a rischio	Prevenzione	Cause	Sintomi
<i>Bacillus cereus</i>	riso bollito, pure di patate e creme	raffreddare rapidamente i cibi e limitare il tempo tra preparazione e consumo	refrigerazione o riscaldamento inadeguati; conservazione a temperatura ambiente, cibi preparati con largo anticipo	dopo 1-6 ore, diarrea, vomito
<i>Clostridium botulinum</i>	conserven preparate in casa, vegetali e sott'olio, salumi, prodotti ittici	rispetto igiene della lavorazione e sterilizzazione conserve	carenze igieniche nella lavorazione; trattamento termico inadeguato delle conserve	vomito di tipo nervoso, assenza di sintomi gastrointestinali, morte per paralisi respiratoria dopo 12-48 ore
<i>Costridium perfringenes</i>	carni poco cotte, sughi di carne, salse	rapido raffreddamento carni cotte, mantenimento alimenti caldi a temperatura superiore a +60°C	cibi conservati a temperatura ambiente e cibi preparati con largo anticipo	dolori addominali, diarrea dopo 8-24 ore
<i>Listeria monocytogenes</i>	carni e prodotti carnei crudi, formaggi, prodotti della pesca	rispetto igiene della lavorazione, cottura, pastorizzazione	scarsa igiene, cottura inadeguata	colpisce soprattutto gli immunodepressi. Febbre, meningite, sintomi parainfluenzali
<i>Salmonella spp.</i>	piatti a base di uova crude, uova e derivati, pollo, carni suine crude	cottura sopra i +60°C, conservazione sotto i +10°C	cottura insufficiente, materie prime contaminate, contaminazione fra alimenti cotti e crudi, portatori sani che manipolano gli alimenti	diarrea, dolori addominali, nausea, vomito, febbre dopo 12-36 ore
<i>Staphylococcus aureus</i>	alimenti molto manipolati (carni trite, creme), gelati e latticini	rispetto norme igieniche, copertura ferite, lavaggio frequente delle mani, rispetto della temperatura	Scarsa igiene di manipolazione su alimenti, usare attrezzature non sanificate	vomito, diarrea, dolori addominali dopo 1-6 ore
<i>Vibrio paraemolitycus</i>	pesce crudo, molluschi	cottura, evitare consumo di pesce crudo	pesce crudo o mal cotto	diarrea profusa, nausea, vomito, febbre dopo 12-36 ore
<i>Campilobacter spp.</i>	prodotti carnei e carne, latte	cottura carni, evitare consumo di carni poco cotte o crude	consumo di carni crude o poco cotte, contatto diretto con animali affetti.	diarrea, nausea, vomito

**Tab. n.1:** schema delle principali fonti di contagio, batteri responsabili delle malattie alimentari, sintomi ed azioni preventive [2]

## 1.2 - TRASMISSIONE DEI BATTERI DAGLI ALIMENTI

### ALL'UOMO

Come citato precedentemente, si definiscono microrganismi patogeni quei microrganismi (batteri, virus o parassiti) dannosi per la salute dell'uomo, che possono essere presenti nell'acqua e negli alimenti, contaminandoli con diverse modalità. Gli alimenti contaminati, una volta ingeriti, possono provocare malattie solo se i microrganismi riescono a superare le barriere difensive dell'uomo. I microrganismi patogeni possono essere già presenti nell'alimento all'origine (ad esempio nelle carni o nei prodotti di animali infetti o malati; sui vegetali irrigati con acque contaminate o che vengono a contatto con terreno contaminato), oppure possono contaminare l'alimento nelle varie fasi della preparazione per cause diverse quali:



- manipolazione con le mani sporche da parte di soggetti asintomatici:
  - persone che, pur non essendo malate, ospitano microrganismi nelle vie aeree o nell'intestino e li eliminano attraverso le secrezioni o le feci;
  - persone con infezioni localizzate nelle vie aeree, nell'intestino, con ferite alle mani, con infezioni della pelle;
  - persone con scarso livello di igiene;
- uso di acqua non potabile o, comunque, contaminata;
- contatto dell'alimento con superfici di lavoro, utensili, contenitori non puliti;
- uso, nella preparazione, di ingredienti inquinati;
- contatto dell'alimento con altri cibi contaminati;
- esposizione dell'alimento, dopo la preparazione, a insetti, roditori o altri animali.

Il manifestarsi di una malattia dipende dallo stato immunitario dell'ospite e da quanto questo riesce a difendersi. L'organismo umano dispone della capacità di

opporsi al danno provocato da microrganismi con numerose difese immunitarie che dipendono dall'età (i bambini e gli anziani sono più deboli), dalle condizioni generali dell'organismo, dagli stati di stress, da altre malattie presenti. Da parte sua, il microrganismo è dotato di potere patogeno, cioè la sua capacità, più o meno elevata, di procurare danni e di carica, cioè il numero di microrganismi presenti in un alimento, di mobilità e di capacità di diffusione delle tossine prodotte. A volte, infatti, è contaminata solo una parte di alimento che, se ingerita, è nociva solo per chi ha consumato quella particolare porzione. Generalmente, maggiore è la quantità di cibo contaminato ingerita, maggiore è la possibilità di manifestare la malattia (anche se, per alcune intossicazioni quali il botulismo è sufficiente ingerire piccolissime quantità di alimento). Esistono delle condizioni nelle quali i microrganismi si sviluppano più facilmente, vanno quindi tenuti sotto controllo la temperatura, l'intervallo di tempo, l'umidità, l'acidità e le condizioni di crescita.

### ***Temperatura***

L'intervallo di temperatura entro il quale i microrganismi possono crescere varia con le specie microbiche. Ciascun ceppo di microbi ha comunque una sua temperatura ottimale di vita e di crescita. Il freddo può rallentare o inibirne la riproduzione ma non li elimina. In questi ambiti, i batteri hanno diversi comportamenti: Alla temperatura di congelamento ( $-18^{\circ}\text{C}$ ), i microbi non muoiono, bensì restano, per così dire, in letargo senza riprodursi. In queste condizioni il rischio legato alla proliferazione batterica è bassissimo, quasi nullo. In regime di temperatura refrigerata (tra  $0^{\circ}$  e  $+4^{\circ}\text{C}$ ) la maggior parte dei microbi si trova in una fase di pausa. Solo alcuni ceppi possono riprodursi, a queste temperature, anche se molto lentamente, mentre altri ceppi possono tendere ad una lenta riduzione del

<b>Intervallo di temperatura</b>	<b>Effetto sui batteri</b>	<b>Localizzazione</b>
-18°/-20°C	i batteri non si dividono ma restano capaci di farlo una volta tornati a temperatura ottimale	all'interno di freezer e congelatori.
0°/+4°C	alcuni ceppi si riproducono molto lentamente, altri si mantengono inalterati, pochi tendono lentamente a ridursi numericamente; in tutti i casi un aumento di temperatura ripristina la capacità di riprodursi.	all'interno di dotazioni frigorifere.
+18°/+45°C	è l'intervallo ottimale di crescita di tutti i batteri (specialmente per i batteri patogeni).	alimenti conservati all'aria
+45°/+65°C	al crescere della temperatura si arresta la crescita e si riduce gradualmente il numero dei batteri.	fasi di riscaldamento e raffreddamento degli alimenti.
+65°/+100°C	i batteri vengono eliminati sempre più velocemente all'aumentare della temperatura.	fasi di riscaldamento e raffreddamento degli alimenti.
+100°/+250°C	vengono eliminati tutti i batteri; all'aumentare della temperatura vengono eliminate gradualmente anche le tossine batteriche.	fasi di cottura degli alimenti

**Tab.n.2:** effetti della temperature sulla crescita batterica. [1]

numero di cellule vitali. A temperatura ambiente, sopra il regime refrigerato e fino a +45°C e, in qualche caso, anche a temperature superiori, la maggior parte degli stipiti batterici cresce molto bene, soprattutto i batteri patogeni che in queste condizioni possono produrre le loro tossine. A regimi di temperatura crescente, da +45° a +65°C e oltre, i batteri diventano gradualmente incapaci di dividersi e poi, ad un ulteriore crescita della temperatura, essi muoiono, compresi i batteri potenzialmente patogeni. Purtroppo, invece, le tossine resistono a queste temperature e possono provocare intossicazioni anche dopo che i batteri sono stati eliminati. Durante le operazioni di cottura con temperature superiori a +100°C normalmente resistono solo le spore di alcuni batteri e muffe e alcune tossine termoresistenti, mentre tutti gli stipiti microbici muoiono rapidamente. Quindi, nell'intervallo tra +4°C e +65°C c'è un aumento del rischio microbiologico, dato che in questo ambito avviene la

proliferazione microbica con possibile produzione delle relative tossine. All'interno di questo intervallo, poi esiste un *optimum* per le crescite batteriche, tra +20°e +45°C, che deve essere assolutamente evitato in quanto, a queste condizioni, la velocità di crescita aumenta enormemente, specialmente degli stipiti potenzialmente patogeni e in poche ore viene compromessa gravemente la salubrità degli alimenti.[1]

### ***Intervallo di tempo***

Se i batteri incontrano le condizioni favorevoli cominciano a moltiplicare. Come già detto, in condizioni ottimali, si verifica una divisione cellulare ogni 20-30 minuti ed in poche ore una singola cellula può proliferare, moltiplicandosi fino a generare miliardi di cellule batteriche.

### ***Frazione di acqua libera***

L'acqua libera rappresenta un fattore di crescita essenziale per tutti i tipi di microbi. Per acqua libera ( $A_w$  = acqua effettivamente disponibile) non s'intende tutta l'umidità presente nell' alimento ma quella effettivamente disponibile per i processi di crescita cellulare dei microbi. Per questo gli alimenti con un basso contenuto di  $A_w$  sono più sicuri e più facilmente conservabili di quelli con un maggior tenore d'acqua e perciò più deperibili in quanto soggetti facilmente a proliferazione microbica. Nella stagione estiva per l'azione combinata di umidità e temperatura il rischio e la frequenza delle malattie alimentari aumentano.

### ***Acidità***

L'unità di misura dell'acidità è il pH. L'acqua pura ha pH 7, cioè è neutra. Sono gradualmente sempre più acide le sostanze che presentano un pH con valori decrescenti da pH 7 a pH 0 , mentre sono basiche le sostanze che presentano valori da pH 7 a pH 14. Anche gli alimenti sono classificati acidi o basici seguendo gli

stessi parametri. Avremo perciò alimenti acidi, neutri o basici. Su di essi i batteri si svilupperanno più o meno, a seconda delle loro caratteristiche. Gli alimenti commestibili per l'uomo esprimono normalmente un intervallo di pH tra 3 e 8. I batteri possono essere presenti, vivere e proliferare in un intervallo di pH da 4,5 a 9,5/11.

### ***Adeguato substrato di crescita***

I microrganismi necessitano di costituenti per la loro crescita e riproduzione. Pertanto, negli alimenti essi trovano una ampia disponibilità di sostanze nutritive da utilizzare per portare a termine i loro processi cellulari compresa, per i patogeni, la produzione di tossine. Le esigenze nutrizionali sono le più varie ma, in generale, essi prediligono i cibi tiepidi piuttosto che quelli troppo freddi o troppo caldi, quelli più ricchi di umidità (acqua libera) piuttosto che quelli secchi, quelli con un più alto contenuto calorico invece di quelli poveri e i cibi più elaborati invece di quelli più semplici. [1]

### ***Tossine batteriche***

Molti batteri patogeni sono in grado di generare quadri patologici non solo per la loro presenza ma, specialmente, perché producono sostanze che alterano il metabolismo e attaccano tessuti viventi danneggiandoli. Queste sostanze definite tossine, sono in alcuni casi resistenti al calore. Vengono prodotte normalmente a temperature comprese tra i +10° e +45°C.

### ***Spore batteriche***

La maggior parte dei batteri muore in assenza di sostanze nutritive o in condizioni ambientali sfavorevoli. Alcuni batteri, tuttavia, se posti in condizioni ambientali sfavorevoli sviluppano delle forme quiescenti chiamate spore che sono dotate di involucri protettivi resistenti alle condizioni esterne, consentendo loro di

superare le avverse condizioni ambientali. Alcune spore possono resistere alle normali temperature di cottura per dare vita alla forma vegetativa (batterio) allorquando le condizioni ambientali ritornino favorevoli. Il batterio può dunque, una volta superate sotto forma di spora le avverse condizioni, riprendere a moltiplicarsi e produrre tossinfezioni alimentari. Per dare un esempio le spore di *Bacillus cereus*, responsabile di molte intossicazioni, possono resistere per parecchi minuti a +121°C e una volta sopravvissute possono germinare e quindi riprendere a moltiplicarsi.

### ***Virus***

I virus hanno dimensioni inferiori di quelle dei batteri. A differenza di questi non si sviluppano negli alimenti, ma debbono svilupparsi all'interno di altre cellule viventi che contaminano gli alimenti ad esempio all'interno di batteri stessi.

I virus vengono eliminati nell'ambiente esterno, normalmente con le feci dei soggetti infetti ed arrivano all'individuo sano con alimenti contaminati. Molti tipi di virus possono giungere all'uomo mediante alimenti inquinati. L'epatite virale di tipo A è un tipico esempio di virus che ha come unico ospite l'uomo: si contrae in seguito all'ingestione di frutti di mare o di verdure non adeguatamente lavate. Viene inattivato dalla bollitura per un tempo superiore ai 5 minuti. [1]

## **1.3 - COLONIZZAZIONE MICROBICA DELLE SUPERFICI E FORMAZIONE DI BIOFILM**

Con il termine *biofilm* si indica, nel settore alimentare, una matrice biologicamente attiva, formata da cellule microbiche e da sostanze extracellulari adese ad una superficie solida.

Lo sviluppo di biofilm può avvenire in ambienti umidi e non sterili, su quasi tutti i tipi di superfici, e la loro formazione è un processo dinamico che si verifica in tappe successive. Aderire ad una superficie è, per i microrganismi, una situazione favorevole dal punto di vista metabolico; infatti, sulle superfici che sono state a contatto con gli alimenti, le molecole organiche e inorganiche si concentrano, formando un film con elevate presenza di nutrienti, che vengono rapidamente assimilati. Una volta adese, le cellule microbiche iniziano a degradare i nutrienti e a produrre strutture e molecole che favoriscono la loro adesione nonché la loro moltiplicazione.

L'adesione dei batteri e la loro successiva produzione di diverse sostanze causano numerosi problemi alle industrie alimentari. L'incrostazione biologica negli scambiatori di calore e nelle torri di raffreddamento, per esempio ha costituito un problema importante per molti anni, in quanto l'adesione dei batteri riduce anche il trasferimento di calore e l'efficienza operativa delle attrezzature.

Nei sistemi di filtrazione, la formazione di biofilm diminuisce notevolmente la permeabilità delle membrane.

Oltre a danneggiare gli impianti, i biofilm possono costituire un pericolo per la salute, se i microrganismi coinvolti sono batteri patogeni e vengono cedute cellule agli alimenti con cui sono a contatto. Ad esempio, *Listeria monocytogenes* è stata trovata in biofilm formati su pareti, pavimenti e superfici di impianti per produzioni alimentari, così come spore di *Clostridium botulinum*. Nel caso di questi microrganismi i problemi creati sono particolarmente gravi perché *Listeria* cresce anche a temperature di frigorifero, mentre le spore di *Clostridium* resistono ad alte temperature e a trattamenti termici.



### Microorganismi produttori di biofilm

- *Pseudomonas spp.*;
- *Staphylococcus spp.*;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Salmonella spp.*;
- *Clostridium spp. e Bacillus spp.*;
- *Lactobacillus spp.*;
- *Escherichia coli*;
- *Yersinia enterocolitica*;
- *Campylobacter jejuni*.

La formazione di un biofilm è un processo complesso, che può iniziare con l'adesione anche di una singola cellula batterica. Nell'ambiente di una azienda alimentare ciò può accadere in un tempo relativamente breve e a seconda dell'ambiente circostante, della superficie e della natura del batterio stesso.

Numerosi microrganismi sono in grado di formare biofilm su materiali come vetro, acciaio inox, polipropilene e gomma, materiali che sono molto utilizzati nel settore alimentare, ma anche su nylon teflon e alluminio: questo avviene in modo particolare quando sono presenti fessurazioni in cui le cellule possono insinuarsi e sopravvivere anche alle operazioni di sanificazione.

L'adesione alle superfici si realizza fondamentalmente in due fasi: una reversibile seguita da una irreversibile.

- Fase di adesione reversibile: primo stadio della formazione del biofilm. E' rappresentato dal contatto dei microrganismi con le superfici (adsorbimento): un processo fisico-chimico tra le molecole presenti sulla superficie delle cellule microbiche e quelle del materiale che le circonda. Quando le cellule aderiscono alla

superficie (distanza minore a 1,5 nm) intervengono specifiche interazioni che determinano un'adesione irreversibile, grazie anche alla produzione da parte dei microrganismi di esopolisaccaridi. In questo stadio, la rimozione delle cellule è ancora possibile, ma con una azione più energica quale il raschiamento delle superfici, poiché le fibrille polimeriche legano saldamente le cellule batteriche al substrato.

Generalmente, superfici che vengono a contatto con miscele contenenti proteine tendono rapidamente a rivestirsi con un film proteico; questo porta spesso a modificazioni delle proprietà dell'interfaccia solido-liquido che facilitano l'attacco dei batteri. Seguono quindi i due stadi della fase irreversibile:

- a) fissazione, che avviene grazie alla liberazione dei polisaccaridi extracellulari prodotti dai microrganismi. Si genera uno strato vischioso (glicocalice) che protegge le microcolonie formatesi, consentendone la sopravvivenza. In altri casi la fissazione avviene ad opera di altre sostanze presenti sulla superficie o tramite organelli cellulari quali i pili e le fimbrie;
- b) colonizzazione: le microcolonie dei batteri fissati confluiscono formando il biofilm.

### ***Resistenza dei batteri nei biofilm.***

Le cellule batteriche che colonizzano una superficie all'interno di un biofilm mostrano una maggiore resistenza a sostanze antimicrobiche rispetto a cellule libere in sospensione. Il fenomeno è stato generalmente attribuito alla minor velocità di diffusione dei biocidi attraverso la matrice dei biofilm.

All'interno dei biofilm i batteri si presentano in vari stadi di sviluppo, poiché nella matrice esistono differenti gradienti di nutrienti e di potenziali ossidoriduttivi: le cellule site in profondità ricevono quantità di alimenti e ossigeno inferiori rispetto a

quelli presenti sulla superficie. Quando lo spessore del biofilm è elevato, sono presenti in esso molte cellule batteriche in fase stazionaria, che in questo stato semi-quiescente mostrano una minore sensibilità ad antibiotici, disinfettanti e sanificanti in genere, e ciò è una caratteristica dei biofilm.

La presenza di strutture specializzate denominate *adesine* sulla superficie dei batteri favorisce l'adesività e la successiva formazione del biofilm.

Le spore presentano generalmente una maggior rapidità di adesione rispetto alle cellule vegetative; ciò è dovuto alla loro alta idrofobicità e alla presenza di strutture "lanuginose" superficiali. Dopo l'adesione alle superfici, le spore possono germinare e le cellule vegetative producono polisaccaridi extracellulari che favoriscono il consolidamento del biofilm. Lo sviluppo di queste cellule è continuo e copre progressivamente tutta la superficie disponibile.

Anche il pH e la temperatura della superficie di contatto influiscono sul grado di adesività dei microrganismi. Batteri come *Pseudomonas* mostrano la massima capacità di adesione alle superfici di acciaio inossidabile con pH compresi tra 7 e 8, ottimali per il loro sviluppo. Allo stesso modo si comportano *Yersinia enterocolitica* e *Listeria monocytogenes*.

Nell'industria lattiero-casearia e dei prodotti carnei predominano i generi *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. In tali ambienti, la persistenza di microrganismi sotto forma di biofilm può causare contaminazioni post-lavorazione riducendo la *shelf-life* del prodotto.

Capacità di colonizzare superfici è stata riscontrata anche in *Campylobacter jejuni* ed *Escherichia coli* O157:H7: la presenza di tali specie è stata spesso correlata a bioaerosol che si producono durante le operazioni di pulizia delle superfici.

La composizione di biofilm può essere eterogenea: i biofilm formati da diverse specie batteriche sono più resistenti rispetto a quelli monospecie, poiché si ritiene che gli esopolisaccaridi prodotti da batteri differenti conferiscano maggiore stabilità. [1]

#### **1.4 - BATTERI PRESENTI NEGLI ALIMENTI**

Negli alimenti sono presenti diverse tipi di batteri: quelli “utili” per gli alimenti, presenti naturalmente o aggiunti volontariamente dall’uomo nei processi produttivi per ottenere determinate caratteristiche e benefici nell’alimento, quelli che provocano l’alterazione dell’alimento (i cosiddetti batteri “alteranti”) e, infine i batteri “patogeni” pericolosi per la salute del consumatore.

Tra i batteri utilizzati nella produzione degli alimenti, vi sono diversi generi quali:

- i batteri lattici: presenti naturalmente sulle materie prime, o aggiunti agli alimenti come componenti di colture *starter* e/o protettive, trovano largo impiego nella produzione di una grande varietà di alimenti fermentati, come derivati del latte, della carne, di vegetali, di prodotti da forno, insilati e altri, contribuendo in vari modi nel determinare le loro caratteristiche e la loro stabilità.
  - Tra i generi di batteri lattici si ricordano: *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Weissella*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Tutti questi sono di forma bastoncellare, Gram-positivi, non sporigeni, catalasi negativa, anaerobi ossigeno-tolleranti; inoltre possono essere omofermentanti o eterofermentanti e fermentano il glucosio, sono acidodurici o acidofili e se ne riconoscono più di cento specie.

- Gruppo degli streptococchi: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*; Cocchi in catene, Gram-positivi, catalasi e ossidasi negativi. Originariamente suddiviso da Sherman nel 1937, sulla base di caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche in quattro gruppi:
  - piogeni o streptococchi emolitici;
  - *Viridans* o streptococchi orali;
  - streptococchi lattici;
  - streptococchi fecali.

Altri batteri utilizzati nelle produzioni alimentari sono:

- i batteri acetici, tra cui il più noto, *l'Acetobacter spp.*: sono corti bastoncini Gram-negativi, non sporigeni, producono acido acetico attraverso un'incompleta ossidazione dell'etanolo che blocca il ciclo di Krebs. Alcune specie di batteri acetici sono in grado di ossidare completamente l'etanolo in anidride carbonica e acqua e sono utilizzati nella produzione dell'aceto; tuttavia, possono alterare anche il vino.
- I batteri propionici: alcune specie di *Propionibacterium*, come *Propionibacter shermani*. Sono impiegati come colture *starter* nella fabbricazione di formaggi con classiche occhiature tipo *Emmenthaler*, dovute alla produzione di anidride carbonica derivata dalla fermentazione del lattato. Altre specie presenti in numero consistente in formaggi a media/lunga stagionatura sono responsabili del gonfiore tardivo. Oltre a questi, appartengono ai batteri propionici i generi *Micrococcus* e *Staphylococcus*: sono batteri di forma coccica, Gram-positivi, catalasi positivi, aerobi o anaerobi facoltativi e mesofili. In particolare, i micrococchi sono microrganismi saprofiti e alcune specie di questo genere partecipano alla

maturazione di formaggi e insaccati carnei fermentati. Gli stafilococchi comprendono sia specie entero-tossinogene come *S. aureus*, sia specie di interesse tecnologico come *S. xilosus*, principale coltura *starter* utilizzata nella produzione di insaccati carnei. [3]

- I microrganismi probiotici: All'inizio del 1900, il premio Nobel russo Elie Metchnikoff intuì che ceppi di lattobacilli presenti nello yogurt potevano essere in grado di svolgere un'azione positiva sulla microflora intestinale e dunque apportare benefici per la salute umana. Metchnikoff fu il primo a suggerire l'ingestione di colture vive di batteri lattici, il cui ruolo naturale sarebbe stato quello di prevenire i fenomeni putrefattivi nell'intestino. Da allora molte ricerche sono state condotte in questo campo portando a quello che oggi noi conosciamo come "probiotica".
- I batteri alteranti: come citato sopra, sono responsabili dall'alterazione dell'alimento. L'alterazione di un alimento può essere definita come qualsiasi cambiamento che rende un prodotto inaccettabile per il consumo umano. Con poche eccezioni, tutti gli alimenti, dopo la raccolta o la macellazione o nel corso di ogni fase della loro trasformazione e consumo, vanno incontro ad alterazioni di varia natura che comportano una perdita della loro qualità, con una velocità che è strettamente dipendente dal tipo e composizione dell'alimento, dalle tecnologie di trasformazione e dalle modalità di conservazione, distribuzione e consumo. La crescita dei microrganismi alterativi è associata alla trasformazione di alcuni componenti alimentari come: carboidrati, proteine, composti azotati non proteici, lipidi ecc. Pertanto, i microrganismi alterativi causano modificazioni dell'alimento tale da renderlo inaccettabile per il consumo umano. In genere soltanto una parte di

questa famiglia di batteri partecipa all'alterazione dell'alimento ed è costituita dai cosiddetti microrganismi alterativi specifici: Gram-negativi (*Enterobacteriacee*), Gram-positivi sporigeni (*Clostridium spp*) e non (*Lactobacillus spp*, *Leuconostoc spp*), lieviti e muffe.

- I batteri patogeni: batteri, presenti negli alimenti e responsabili delle cosiddette malattie alimentari nell'uomo. Come citato inizialmente, gli alimenti possono rappresentare potenziali veicoli di malattie in quanto possono trasferire ai consumatori sostanze chimiche e microrganismi capaci di provocare danni per la salute. La lista delle malattie acute associate ad un veicolo alimentare è aumentata drammaticamente negli ultimi anni. Alcune di queste associazioni sono confermate dal diretto isolamento dell'agente eziologico (chimico e/o biologico) dall'alimento e dal paziente, altre invece sono solo sospettate essere dovute ad agenti trasmessi con gli alimenti.

Tra i vari batteri patogeni si elencano di seguito alcuni tra i più conosciuti:

***Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Yersinia enterocolitica*** : i batteri di questi generi sono caratterizzati dalle caratteristiche generali della famiglia delle *Enterobacteriaceae* a cui appartengono: sono tutte bastoncini Gram-negativi, anaerobi facoltativi non sporigeni.



*Salmonella* è una delle cause principali di tossinfezione di origine alimentare. Particolarmente incriminati sono i prodotti di origine animale dato che il ciclo epidemiologico della malattia è concentrato su uomo e animale.

SPECIES	Beta-GAL	ACIDO DA			Gelatinasi	Utilizzazione malonato
		Dulcitol	Lattosio	Salicina		
<i>Salmonella enterica</i>						
subsp. <i>enterica</i>	-	+	-	-	-	-
subsp. <i>salamae</i>	-	+	-	-	+	+
subsp. <i>arizonae</i>	+	-	+	-	+	+
subsp. <i>diarizonae</i>	+	-	+	-	+	+
subsp. <i>houtenae</i>	-	-	-	+	+	-
subsp. <i>indica</i>	D	D	-	-	+	-
<i>Salmonella bongori</i>	+	+	-	-	-	-

Tab. n.3: principali differenze biochimiche tra diverse salmonelle. [3]

La nomenclatura e la classificazione dei batteri del genere *Salmonella* è stata sempre molto complessa e nel tempo ha subito diverse modificazioni. Oggi sono riconosciute due specie principali e diverse sotto specie mediante differenze biochimiche (v. Tab. n.3).

*Shigella* è responsabile di malattie del tratto gastrointestinale; questi batteri sono coinvolti in episodi epidemici da alimenti quali: vegetali, prodotti della pesca, pollo, latte e derivati e acqua. *Yersinia enterocolitica* invece è responsabile di enteriti nell'uomo. [3]



*Bacillus cereus*: è un microrganismo ubiquitario, Gram-positivo, aerobio facoltativo, sporigeno, a forma bastoncellare allungata (cellule vegetative), le cui spore non emettono lo sporangio. Queste ed altre caratteristiche, come quelle metaboliche (test



biochimici), sono utilizzate per distinguere e confermare la presenza di *B. cereus* in matrici organiche, anche se alcune di queste caratteristiche sono condivise da più tipi di bacilli come *B. mycoides*, *B. thuringiensis* e *B. anthracis*. La distinzione tra questi organismi dipende infatti da motilità (*B. cereus* ha la possibilità di muoversi), presenza di tossine (*B. thuringiensis*), capacità di attività emolitica (*B. cereus* e altri



sono beta emolitici, mentre *B. anthracis* non lo è), e crescita di rizoidi (specifico di *B. mycoides*). [4]

***Clostridium botulinum***: è un batterio Gram-positivo, sporigeno, con uno sporangio a clostridio che deforma il germe lungo 4-6 µm; appartiene alla famiglia delle *Clostridiaceae*, compreso nel genere cui appartengono anche *Clostridium perfringens* e *Clostridium tetani*.



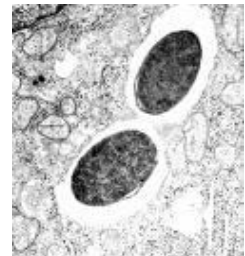
*Clostridium botulinum* cresce in terreni comuni in condizioni di anaerobiosi e in agar sotto forma di colonie cotonose, evanescenti, indefinite. Fermenta il glucosio e il maltosio, producendo idrogeno solforato dal caratteristico odore di uova marce; inoltre, è proteolitico, ossia idrolizza i substrati proteici quali carne, caseina, uovo coagulato, siero coagulato ecc. In laboratorio, quindi, liquefa le gelatine producendo odore putrido e in brodo comune determina un intorbidamento diffuso.

Esistono sette tipi di *Clostridium botulinum*, distinti da sette tipi di esotossine:

- *Clostridium botulinum A*: proteolitico, emolitico, si ritrova nei prodotti vegetali, diffuso negli USA.
- *Clostridium botulinum B*: proteolitico, presente nei prodotti carnei, diffuso in Europa.
- *Clostridium botulinum C*: non interessa la patologia umana.
- *Clostridium botulinum D*: non interessa la patologia umana.
- *Clostridium botulinum E*: non proteolitico, cresce a +3 °C anche a pH acido (4-8) e si trova in pesce affumicato, merluzzo, aringhe, tonno conservato.
- *Clostridium botulinum F*: raro, osservato nei paté di fegato.

- *Clostridium botulinum* G: attualmente nessuna evidenza di tossinfezione alimentare.

***Clostridium perfringens***: (noto in precedenza come *Clostridium welchii*) batterio Gram-positivo, a forma di bastoncello, anaerobio e sporigeno, appartenente al genere *Clostridium*. *C. perfringens* è ubiquitario in natura e può essere trovato come un



normale componente nei vegetali in decomposizione, nel sedimento marino, nel tratto intestinale degli esseri umani e di altri vertebrati, negli insetti e nel suolo. Virtualmente ogni campione di suolo che sia esaminato, ad eccezione delle sabbie del Sahara, contiene *C. perfringens*. [5]

***Listeria monocytogenes***: batterio ubiquitario che vive nel terreno e nelle acque e contaminare i vegetali e gli alimenti lavati con acqua contaminata. [2] È di forma bastoncellare, Gram-positivo, mobile per la presenza di flagelli, anaerobio facoltativo ed



emolitico. Fa parte dei batteri psicotrofi (che sopravvivono a temperature inferiori a +5°C), infatti ha la caratteristica di mantenere la sua vitalità anche ad una temperatura di 0°C ed ha un *optimum* di crescita di +37°-+38°C. Il genere *Listeria* si divide in sette specie, delle quali *L. monocytogenes* causa listeriosi nell'uomo. Si conoscono 13 sierotipi diversi di *Listeria monocytogenes* che possono infettare l'uomo causando listeriosi. Il *range* di pH per la crescita del batterio va da 5 a 10, con un *optimum* di pH di 7-8. [2]

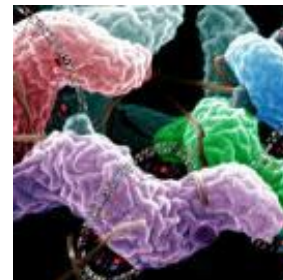
*Campylobacter*: genere di batteri appartenente alla famiglia Campylobacteraceae. Microaerofilo, termofilo, di forma spirillata, Gram-negativo, ciliato, quindi mobile. [2] (v. cap. 2, pagg. 26-42)



## CAP. 2 - *CAMPYLOBACTER*

*Alberto Zancanaro*

La classificazione di *Campylobacter* ha subito molti cambiamenti da quando questi batteri sono stati isolati all'inizio di questo secolo. Tuttavia, le tecniche di biologia molecolare in particolare (il sequenziamento dei geni rRNA



16S), la caratterizzazione delle proteine dei lipidi della parete cellulare, la caratterizzazione serologica e l'analisi delle proprietà biochimiche del batterio hanno risolto molte questioni dal punto di vista tassonomico. Questo genere, assieme ad *Helicobacter*, *Arcobacter* e *Flexispira*, appartiene alla stessa superfamiglia di batteri ad RNA, che consiste di batteri Gram-negativi, forma di spirale, con una bassa percentuale di C-G nel DNA, incapaci di fermentare o ossidare i carbonati e in grado di crescere in ambiente microaerofilo. *Campylobacter* e *Arcobacter* sono raggruppati nella famiglia *Campylobacteriaceae*.

Il genere *Campylobacter*, dal greco *kampylos* che significa “curvato”, è costituito da batteri Gram-negativi a forma di virgola, ossidasi e catalasi positivi e mobili grazie ad un flagello polare.

Il principale antigene è il lipopolisaccaride della membrana esterna. Tale microrganismo cresce meglio in un'atmosfera a bassa percentuale d'ossigeno (dal 5 al 7 %, microaerofilo) e ad un'elevata percentuale di anidride carbonica (dal 5 al 10 %). Le dimensioni del batterio sono piccolissime da 0,3 a 0,6  $\mu\text{m}$  di diametro, infatti riescono a passare attraverso filtri con pori di 0,45  $\mu\text{m}$  di diametro dove altri batteri invece rimangono trattenuti. [2]

Gli animali da reddito in cui questo organismo vive abitualmente sono in particolare bovini, polli e uccelli che all'osservazione appaiono sani; è stato trovato anche nelle mosche. Non è chiaro come avvenga la trasmissione nel pollo, ma studi recenti sembrano escludere la trasmissione verticale (cioè attraverso le uova). I cuccioli di cane e di gatto, ma anche maiali e roditori sono altri portatori asintomatici. A volte si trova anche in acqua non clorata. Per quanto riguarda la popolazione umana, sembra che almeno in Europa e USA gli individui sani non sono portatori.

Prima del 1972, cioè da quando sono migliorate le pratiche per coltivare questo microrganismo, si riteneva che esso fosse principalmente un batterio patogeno per animali (bovini, ovini) nei quali causa aborti. Oggi si sa che il *Campylobacter spp.* è probabilmente il principale patogeno veicolato dagli alimenti, che negli USA causa più gastroenteriti di *Salmonella spp* e *Shigella spp* messe insieme. Secondo l'organismo di controllo americano *Food and Drug Administration* (FDA), i meccanismi della patogenesi non sono ancora chiari, ma il batterio sicuramente produce una tossina sensibile al calore e può comportarsi anche da organismo invasivo. [6]

L'identificazione preliminare dei ceppi isolati si basa sulla crescita in condizioni

Caratteristica	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. fetus</i>
Ossidasi	+	+	+
Catalasi	+	+	+
Riduzione dei nitrati	+	+	+
Ureasi	-	-	-
Idrolisi di ippurato	+	-	-
Idrolisi di acetato idrossile	+	+	-
Crescita a +25 °C	-	-	+
a +37 °C	+	+	+
a +42 °C	+	+	-
Crescita in 1% di glicina	+	+	+
Sensibilità a acido nalidixico	S	S	V
Sensibilità a cefalotina	R	R	S

**Tab. n.4:** proprietà fenotipiche dei principali *Campylobacter*. (Legenda: S=sensibile, R=resistente, V=variabile) [2]

selettive, sulla tipica morfologia al microscopio e sull'individuazione di attività ossidasica e catalasica. L'identificazione definitiva di tutti i ceppi isolati viene effettuata secondo le proprietà fenotipiche manifestate dal ceppo isolato nelle reazioni riassunte come esempio nella precedente tabella 4.

In quest'altra tabella (Tab. n.5) sono riportate alcune delle più importanti specie associate a malattie nell'uomo.

<b>SPECIE</b>	<b>OSPITE SERBATOIO</b>	<b>MALATTIA NELL'UOMO</b>	<b>FREQUENZA</b>
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Jejuni</i>	polli, suini, bovini, cani, gatti, uccelli, visoni, conigli, insetti.	gastroenterite, setticemia, meningite, aborto spontaneo, proctite, <b>sindrome di Guillain Barrè</b>	comune
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>Doylei</i>	Uomo	gastroenterite, gastrite, setticemia	non comune
<i>C. coli</i>	suini, polli, bovini, ovini, uccelli	gastroenterite, enterite, setticemia, aborto spontaneo, meningite.	non comune
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	bovini, ovini	setticemia, gastroenterite, aborto spontaneo, meningite.	non comune
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	bovini	setticemia	non comune
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>Hyointestinalis</i>	suini, bovini, criceti, cervi	gastroenterite	rara
<i>C. concisus</i>	Uomo	malattia periodontale, gastroenterite	rara
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>Sputo rum</i>	Uomo, bovini, suini	ascessi, gastroenterite	rara
<i>C. curvus</i>	Uomo	malattia periodontale, gastroenterite	rara
<i>C. rectus</i>	Uomo	malattia periodontale	rara
<i>C. showae</i>	Uomo	malattia periodontale	rara
<i>C. gracilis</i>	Uomo	malattia periodontale, enfisema, ascessi	rara
<i>C. upsaliensis</i>	cani, gatti	gastroenterite, enfisema, ascessi	rara
<i>C. lari</i>	polli, uccelli, cani, gatti, scimmie, equini, foche	gastroenterite, setticemia	rara
<i>C. candensis</i>	volatili (Gru d'America)	gastroenterite	rara

**Tab. n.5:** quadro principale di epidemiologia del *Campylobacter* [2].

## 2.1 - PATOLOGIE INDOTTE DA *CAMPYLOBACTER*

### *La campilobatteriosi.*

La campilobatteriosi è' la principale malattia che si contrae attraverso la contaminazione alimentare da *Campylobacter spp.*. Descritta negli anni Cinquanta come rara batteriemia nelle persone immunocompromesse, nel 1972 è stata individuata come causa di malattie diarroiche. La maggior parte delle infezioni (circa il 90%) è provocata dalle specie *C. jejuni* e *C. coli*, mentre meno frequenti sono quelle causate dalle specie *C. lari*, *C. fetus* e *C. upsaliensis*.

La campilobatteriosi è una delle malattie batteriche gastrointestinali più diffuse al mondo e il suo tasso di incidenza ha superato in alcuni Paesi europei la percentuale di salmonellosi non tifoidee. La sua diffusione negli ultimi 10 anni ha, infatti, registrato un notevole incremento e rappresenta un problema di salute pubblica di impatto socio-economico considerevole. [7]

L' Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) pubblica regolarmente nel suo rapporto annuale comunitario sulle malattie infettive trasmissibili agli animali all'uomo l'incidenza di cittadini dell'Unione Europea infettati ogni anno. Nel 2005 la campilobatteriosi ha superato la salmonellosi come più frequente infezione di origine animale trasmessa all'uomo nell'Unione Europea. Nel 2007 i casi di infezioni da *Campylobacter spp* denunciati nell'uomo sono aumentati del 14,2% rispetto all'anno precedente, raggiungendo un totale di 200.507 casi denunciati. La sorgente primaria delle più comuni infezioni da *Campylobacter spp* è dovuta a carne di pollo, positiva nel il 66% dei campioni esaminati.

Lo stesso report fornisce anche dati sulle resistenze agli antibiotici di *Campylobacter spp* provenienti da animali da fattoria e da alimenti di origine animale. Alcuni

risultati indicano un aumento costante della percentuale dei batteri resistenti ad antibiotici comunemente usati per trattare le infezioni umane. Questo dato costituisce una preoccupazione crescente per gli specialisti della salute pubblica, in quanto la presenza di questo sostanzioso serbatoio di batteri resistenti agli antibiotici può compromettere il trattamento efficace delle infezioni nell'uomo. [3]

### ***Sintomi e diagnosi.***

Il periodo di incubazione della campilobatteriosi varia da 1 giorno a 1 settimana, a seconda dei casi. I sintomi sono solitamente lievi o moderati e consistono in diarrea, dolori addominali, febbre, mal di testa, nausea e vomito. La loro durata varia generalmente da 1 a 7 giorni, ma nel 20% dei casi circa, può superare la settimana.

Manifestazioni più gravi della malattia interessano meno dell'1% dei pazienti (solitamente soggetti molto anziani o molto giovani) e includono meningite, endocardite e aborto settico nella donna. Pazienti con deficit immunitari possono presentare infezioni gravi, prolungate e ricorrenti. Il tasso di letalità è basso, ma per i pazienti più vulnerabili (bambini, anziani e immunocompromessi), il cui numero nell'Unione Europea è in crescita, le conseguenze della malattia possono essere molto gravi. La campilobatteriosi può esitare in diverse sequele croniche che includono artrite reattiva, infiammazioni a carico di fegato e reni e la sindrome di Guillain-Barrè (v. cap.3, pagg 87-118).

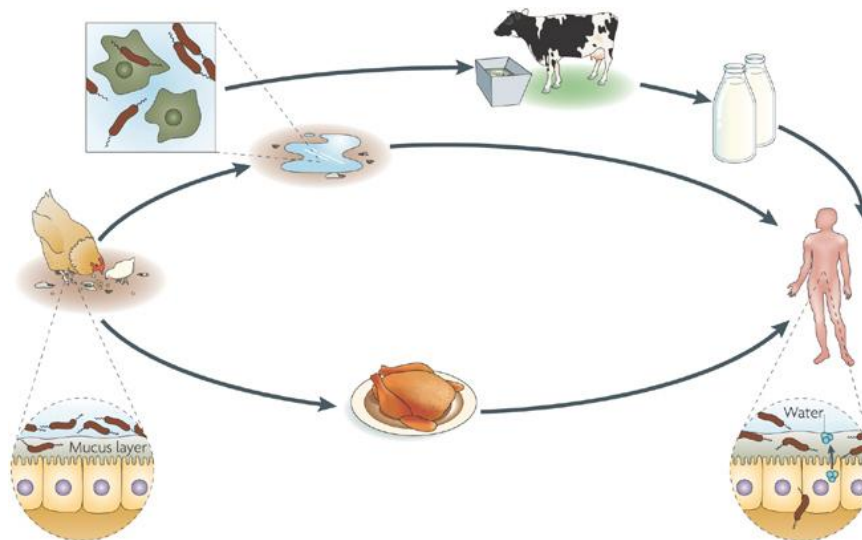
A causa della mancanza di caratteristiche cliniche specifiche, la campilobatteriosi è difficile da distinguere dalle altre patologie gastrointestinali. La diagnosi definitiva può essere effettuata solo attraverso l'analisi microbiologica di campioni clinici.



### **Trasmissione.**

Episodi epidemici di infezione da *Campylobacter spp* sono stati associati prevalentemente al consumo di alimenti a rischio quali acqua o latte contaminati, consumati crudi e, occasionalmente, a carne di pollo.

La trasmissione di *Campylobacter spp* attraverso il latte può essere facilmente controllata tramite la pastorizzazione e quella attraverso l'acqua con un sicuro sistema di potabilizzazione. Carni di maiale e di ruminanti sono generalmente considerate a basso rischio; tuttavia le frattaglie crude di questi animali sono a rischio piuttosto elevato di trasmissione. Anche i prodotti freschi come ad es. frutta e verdura, se consumati crudi, sono a rischio e quindi, per ridurre al minimo la diffusione di *Campylobacter spp*, è indispensabile incrementare l'applicazione di misure di prevenzione, come le Buone Pratiche Agricole (*Good Agriculture Practices, Gap*) e le Buone Pratiche di Manipolazione (*Good Handling Practices, Ghp*), ed evitare l'impiego di acqua contaminata per l'irrigazione dei campi e il



**Fig. n.1:** schema di trasmissione del *Campylobacter spp*. [da: Young KT, Davis LM, DiRita V. (2007) *Nature Review Microbiology*]

lavaggio degli alimenti. Anche i molluschi bivalvi consumati crudi sono potenzialmente a rischio per il consumatore.

All'interno del genere *Campylobacter* si riconoscono diversi biotipi e sierotipi, la cui identificazione può essere usata per studi epidemiologici. E' ancora difficile differenziare ceppi patogeni da non patogeni, tuttavia sembrerebbe che molti degli isolati da pollame siano patogeni.

E' stato riconosciuto un totale di 18 specie di *Campylobacter* secondo il *National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy Database*. [7]

### **Prevenzione.**

Il pollame rappresenta uno dei principali serbatoi delle diverse specie di *Campylobacter*. In Europa la quota di allevamenti risultati positivi alle indagini microbiologiche effettuate è variabile da Paese a Paese e, precisamente, da un minimo del 5% a un massimo del 90%. [8]

Le conoscenze sulle vie di contaminazione del pollo sono ancora incomplete, ma i fattori maggiormente correlati alla diffusione di *Campylobacter spp* sono il livello di biosicurezza, la stagione, l'età del pollame, le modalità di somministrazione dei mangimi, i trasferimenti dei capi da un allevamento a un altro, le condizioni di trasporto del pollame, l'acqua e i medicinali somministrati agli animali.

La contaminazione della carne avviene durante la macellazione, attraverso il contatto con il materiale fecale o con il contenuto intestinale degli animali in macellazione. Il lavaggio della carne dopo la macellazione riduce il rischio di contaminazione, così come il congelamento dei prodotti alimentari. Misure di controllo in tutti i settori della catena alimentare, dalla produzione alla preparazione domestica del cibo, contribuiscono a ridurre il rischio di infezione. L'unico metodo efficace per eliminare *Campylobacter spp* dai cibi contaminati è quello di introdurre un

trattamento battericida come il riscaldamento (cottura o pastorizzazione) o l'irradiazione (raggi gamma).

### ***Terapia e farmacoresistenza.***

Nel trattamento della campilobatteriosi è fondamentale la reidratazione dei liquidi corporei nei pazienti. Il trattamento con antibiotici non è solitamente indicato per le enteriti di moderata gravità. Tuttavia per i pazienti più a rischio, come gli anziani, i pazienti con brividi e sintomi sistemici, gli immunocompromessi e le donne incinte, che solitamente presentano una dissenteria da moderata a grave (diarrea con sangue), il trattamento antibiotico può essere vantaggioso. Le infezioni da *Campylobacter spp* possono essere trattate efficacemente con antibiotici come eritromicina, tetraciclina e fluorochinoloni.

Il fenomeno della farmaco-resistenza da parte delle varie specie di *Campylobacter* è in aumento; è particolarmente allarmante, quella relativa alla resistenza ai fluorochinoloni, identificata in Europa alla fine degli anni Ottanta. Alcuni studi mostrano una correlazione tra l'approvazione all'uso dei fluorochinoloni negli allevamenti e lo sviluppo di campilobatteriosi resistenti ai fluorochinoloni, sia negli animali che nell'uomo. [8]

\*\*\*\*\*

### **LA GASTROENTERITE:**

è un'infezione della mucosa dello stomaco e dell'intestino che si manifesta prevalentemente con sintomi del tratto GI superiore (anoressia, nausea e vomito), diarrea e disturbi addominali.

La perdita di liquidi e di elettroliti associata alla gastroenterite può essere poco più di un semplice inconveniente per un adulto in buona salute, ma può essere molto grave per una persona che non è in grado di sopportarne lo stress (p. es., i soggetti anziani o molto giovani, i soggetti debilitati o quelli con altre malattie concomitanti).

### **EZIOLOGIA ED EPIDEMIOLOGIA**

La gastroenterite può avere un'etiologia aspecifica, incerta o sconosciuta o batterica, virale, parassitaria o tossica. Quando può essere identificata una causa specifica, si può utilizzare il nome specifico della sindrome, evitando il termine meno specifico di "gastroenterite."

L'infezione da *Campylobacter spp* è la causa batterica più frequente della malattia diarroica negli USA, meno frequentemente in Europa. La trasmissione da persona a persona è particolarmente comune con le gastroenteriti causate da *Shigella spp*, *Escherichia coli* O157:H7, *Giardia spp*, virus di Norwalk e Rotavirus. L'infezione da *Salmonella spp* può essere acquisita anche attraverso il contatto con i rettili (p. es., iguana, tartarughe), sempre più frequente tipo di animale domestico.

Le cause virali della gastroenterite includono il virus di Norwalk e i virus Norwalk-simili, i Rotavirus, gli Adenovirus, gli Astrovirus e i Calicivirus. Le epidemie di diarrea virale nei lattanti, nei bambini e negli adulti solitamente si diffondono attraverso l'acqua, i cibi contaminati o la via oro-fecale. Le infezioni da virus di Norwalk si verificano durante tutto l'anno e causano il 40% circa delle epidemie di gastroenterite nei bambini e negli adulti. Durante l'inverno, nelle regioni a clima temperato, i Rotavirus rappresentano la causa principale delle gravi affezioni diarroiche che provocano l'ospedalizzazione dei bambini al di sotto dei 2 anni di età. Gli adulti, che hanno sintomatologia di solito più lievi, probabilmente hanno una protezione immunitaria maggiore.

Alcuni parassiti intestinali, in particolare la *Giardia lamblia* aderiscono o invadono la mucosa intestinale e causano nausea, vomito, diarrea e malessere generale. La giardiasi è endemica in molte regioni a clima freddo (p. es., gli stati delle montagne rocciose, il nord degli USA e l'Europa). La malattia può diventare cronica e causare una sindrome da malassorbimento. Di solito è acquisita con una trasmissione da persona a persona (p. es., nei dayhospital) o bevendo acqua contaminata (p. es., dei fiumi). Un altro parassita intestinale, il *Cryptosporidium parvum*, causa una diarrea acquosa che è a volte accompagnata da dolori addominali crampiformi, nausea e vomito. Nelle persone sane la malattia è, di solito, lieve e autolimitante, ma nei pazienti immunocompromessi l'infezione può essere grave, causando una sostanziale perdita di elettroliti e di liquidi. L'infezione da *Cryptosporidium* è probabilmente contratta più frequentemente bevendo dell'acqua contaminata. Sebbene le uova di *Cryptosporidium parvum* siano più comunemente trovate nelle riserve municipali di acqua, non si sa quale percentuale di rifornimenti idrici contenga uova vitali e infettive.

La gastroenterite virale o influenza intestinale e alcuni tipi di diarrea del viaggiatore possono essere causati da enterotossine batteriche o da infezioni virali.

### **FISIOPATOLOGIA**

Alcune specie batteriche producono enterotossine che ostacolano l'assorbimento intestinale, causando così una eccessiva secrezione di acqua e di elettroliti; in alcuni casi, è stata isolata una tossina chimicamente pura (p. es., l'enterotossina del *Vibrio cholerae*). La sola tossina è in grado di indurre una voluminosa secrezione acquosa da parte del tenue, osservabile clinicamente dimostrando, un preciso meccanismo patogenetico per la diarrea. Le enterotossine costituiscono, probabilmente, il meccanismo responsabile di diverse sindromi diarroiche (p. es., l'enterotossina dell'*E. coli* può causare alcuni episodi di "diarrea pediatrica" e di "diarrea del viaggiatore").

Alcune specie di *Shigella*, *Salmonella* e *E. coli* penetrano nella mucosa del piccolo intestino o del colon e producono ulcerazioni microscopiche, sanguinamento, essudazione di liquido ricco di proteine

e secrezione di acqua e di elettroliti. Il processo invasivo e le sue conseguenze si possono verificare indipendentemente dal fatto che il microorganismo elabori o meno l'enterotossina.

Una gastroenterite può far seguito all'ingestione di tossine chimiche contenute in alcune piante (p. es., funghi, patate e flora da giardino), in prodotti ittici (pesci, vongole e cozze) o in cibi contaminati. L'ingestione di metalli pesanti (arsenico, piombo, Hg e cadmio) può causare, in fase acuta, nausea, vomito e diarrea. Molti farmaci, compresi gli antibiotici a largo spettro, hanno notevoli effetti collaterali sull'apparato GI. Diversi meccanismi svolgono un ruolo importante nello sviluppo della gastroenterite, inclusa l'alterazione della normale flora intestinale.

### **SINTOMI E SEGNI**

Il carattere e la gravità dei sintomi dipendono dalla natura dell'agente causale, dalla durata della sua azione, dalla resistenza del paziente e dall'estensione dell'interessamento dell'apparato GI. L'inizio è spesso improvviso e talvolta drammatico, con anoressia, nausea, vomito, borborigmi, crampi addominali e diarrea (con o senza sangue e muco). A questi sintomi si possono associare malessere generalizzato, dolori muscolari e senso di prostrazione.

Se il vomito causa un'eccessiva perdita di liquidi, si produce alcalosi metabolica con ipocloremia; se è più importante la diarrea, è più probabile che si verifichi acidosi. Il vomito o la diarrea eccessivi possono causare ipokaliemia. Si può sviluppare anche iponatriemia, specialmente se nella terapia di reintegrazione sono usati liquidi ipotonici. La grave disidratazione e lo squilibrio acido-base possono produrre cefalea e sintomi di irritabilità muscolare e nervosa; se la disidratazione è molto grave, si possono verificare shock, con collasso circolatorio e insufficienza renale oligurica.

Alla vista clinica, l'addome può essere disteso e dolorabile; nei casi gravi può essere presente una contrattura muscolare di difesa. Possono essere visibili e palpabili delle anse intestinali distese dai gas. Con lo stetoscopio sono auscultabili i borborigmi, anche senza diarrea (un'importante caratteristica differenziale con l'ileo paralitico). Possono inoltre essere presenti i segni di una deplezione extracellulare di liquidi (p. es., ipotensione, tachicardia).

### **DIAGNOSI**

Può essere importante, durante la raccolta dell'anamnesi la segnalazione di ingestione di cibo potenzialmente contaminato, di acqua di superficie non trattata o di una sostanza nota come irritante per il tratto GI di viaggi effettuati di recente e del contatto con persone affette dagli stessi disturbi. Se i sintomi non regrediscono entro 48 ore, sono indicati l'esame colturale e la ricerca dei globuli bianchi nelle feci. La sigmoidoscopia è utile per la diagnosi differenziale di colite ulcerosa o di dissenteria amebica, sebbene *Shigello* spp e *E. coli* O157:H7 possano produrre lesioni a carico del colon, indistinguibili da quelle della colite ulcerosa. Per emettere una corretta diagnosi può essere necessario anche l'esame colturale del vomito, del cibo e del sangue. La presenza di eosinofilia può indicare un'infezione parassitaria.

Il cosiddetto addome acuto chirurgico non si associa, di solito, a una storia di frequenti evacuazioni, a una normale conta di globuli bianchi o a una leucopenia in assenza di spasmo muscolare e di dolorabilità localizzata. Comunque, a volte si può avere diarrea in corso di appendicite acuta, di ostruzione incompleta del piccolo intestino, in altre emergenze acute intra-addominali e nelle neoplasie del colon.

## PRINCIPI GENERALI DI TERAPIA

La terapia di supporto è la più importante. È consigliato il riposo a letto con la disponibilità di un bagno, di una comoda o di un vaso da letto. Quando la nausea o il vomito sono lievi o sono cessati, la somministrazione orale di soluzioni elettrolitiche con glucosio o di brodo leggero o bollito con l'aggiunta di sale, può prevenire la disidratazione o trattare una lieve disidratazione. Anche se vomita, il paziente deve assumere frequenti ma piccole sorsate di questi liquidi, perché il vomito si può risolvere con la reintegrazione del volume idrico. I bambini si possono disidratare più rapidamente e devono quindi ricevere un'appropriata soluzione reidratante (ne esistono in commercio diversi tipi). I liquidi comunemente usati, come le bevande gassate o le bevande per sportivi, hanno un anomalo rapporto tra glucosio e sodio e quindi non sono adatte per i bambini sotto i 5 anni di età. Se il vomito persiste o se è presente una grave disidratazione, è necessaria l'infusione EV di un'appropriata terapia reintegrativa degli elettroliti.

Se il vomito è grave ed è stata esclusa una condizione chirurgica, può essere utile la somministrazione di un antiemetico (p. es., dimenidrinato 50 mg IM ogni 4 ore o clorpromazina 25-100 mg / die IM) o di proclorperazina (10 mg PO tid). Per il trattamento dei gravi dolori addominali crampiformi può essere somministrata della meperidina, alla dose di 50 mg IM ogni 3 o 4 ore. Deve essere evitata la morfina perché aumenta il tono della muscolatura intestinale e può aggravare il vomito.

Quando il paziente riesce a tollerare i liquidi senza vomitare, un'alimentazione leggera (cereali, gelatina, banane e toast) può essere aggiunta gradualmente alla dieta. Se dopo 12-24 ore persiste una diarrea moderata in assenza di gravi sintomi sistemici o di sangue nelle feci, può essere somministrato difenossilato (2,5-5mg in compresse o sotto forma di sciroppo 2 o 3 volte al giorno) loperamide (2mg PO qid) o bismuto subsalicilato (524 mg PO 6-8 volte al giorno).

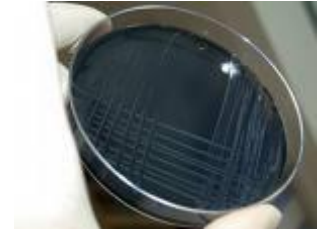
Il ruolo degli **antibiotici** è controverso, anche per le specifiche diarree infettive, ma la maggior parte degli esperti li consiglia nella terapia sintomatica della shigellosi.

Quando è presente un'infezione sistemica devono essere somministrati gli antibiotici appropriati, sulla base dell'antibiogramma. Comunque, gli antibiotici non servono per un rapido miglioramento né per i pazienti con una semplice gastroenterite né per i pazienti portatori asintomatici. Anzi, gli antibiotici possono favorire e prolungare lo stato di portatore della salmonellosi. L'uso indiscriminato degli antibiotici favorisce la selezione di organismi resistenti al farmaco ed è scoraggiato. [9]

\*\*\*\*\*

## 2.2 - TECNICHE CULTURALI

La presenza di *Campylobacter spp.* può essere evidenziata da un esame microscopico a fresco delle feci, osservando i caratteristici bastoncini ricurvi o a spirale e la loro caratteristica motilità.



Le tecniche colturali prevedono l'uso di terreni selettivi: dalle feci di individui ammalati si isolano facilmente senza ricorrere ad arricchimento, mentre dagli alimenti è necessario arricchire il campione in particolari terreni già pronti in commercio che contengono numerosi antibiotici quali vancomicina, polimixina B, trimetoprim, ciloeximide e sangue (ad es. di cavallo).

Segue poi l'isolamento in terreni selettivi cui vanno aggiunti al momento dell'uso antibiotici e sangue per lo più di cavallo. Le colonie crescono, dopo opportuna incubazione del terreno, per lo più entro 48 ore senza dare emolisi, di colore grigio, piatte, irregolari e appaiono costituite da bastoncini Gram-negativi ricurvi o ritorti a spirale.

### ***Ricerca di Campylobacter spp.***

Per la ricerca di *Campylobacter spp.* sono previste una serie di passaggi successivi:

- 1) fase di arricchimento: 25 g di prodotto in 225 ml di brodo di acqua peptonata alcalina; incubazione a +43°C per 18 ore in giare per microaerofilia (*gas pack*);
- 2) striscio di conferma: si eseguono strisci multipli su terreno di Skirrow. Incubazione a +43°C per 18-24 ore in condizioni anaerobiche:

#### **Composizione dei terreni**

##### Acqua Peptonata Alcalina (pH 9)

- Peptone 10 g;
- acqua distillata 1000ml;
- NaCl 5 g.

##### Terreno di Skirrow (pH 7,4)

- Proteose peptone 10 g
- NaCl 5 g
- Fegato digerito 2,5 g
- Agar 12 g
- Estratto di lievito 5 g
- Acqua distillata 1000 ml

Dopo sterilizzazione, raffreddare sino a circa 50 °C, quindi prima di porre in piastra aggiungere:

- sangue sterile 7%
- vancomicina 10 µg/ml
- polimixina B 2,5 I/ml
- trimetoprim 5 µg/ml

le colonie crescono sciamando lungo lo striscio. Solo successivamente le colonie sospette sono sottoposte a successiva identificazione;

- 3) prove di identificazione. Queste comprendono diversi test quali:
  - a. idrolisi dell'ippurato;
  - b. produzione di H<sub>2</sub>S;
  - c. sensibilità dell'acido nalidixico.

### **2.3 - *CAMPYLOBACTER jejuni***

E' la specie di maggior interesse all'interno del genere *Campylobacter* e fa parte dei cosiddetti batteri patogeni emergenti. *C. jejuni*, è direttamente implicato nello sviluppo della sindrome di Guillain-Barrè



Il batterio è uno dei microrganismi che si trova negli alimenti con più frequenza.

Il *Campylobacter jejuni* è stato considerato seriamente come potenziale patogeno alimentare solo dagli anni Settanta, ma è probabilmente responsabile del doppio delle enteriti di cui si ha notizia rispetto alla ben più famosa *Salmonella*. Originariamente fu considerato un organismo non dannoso commensale di alcuni animali; uno degli aspetti ancora meno noti del suo comportamento biologico è come possa vivere nell'apparato digerente degli uccelli senza provocare malattie e, al tempo stesso, essere un batterio patogeno così invasivo per gli esseri umani. La carica di *Campylobacter spp.* necessaria per causare un'infezione è molto bassa (10-1000 UFC/g) e negli ultimi 20 anni è aumentata l'incidenza della sua presenza nelle malattie alimentari, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. I soggetti sani non sono portatori di questo microrganismo ed esso non viene trasmesso dalle persone infette a



quelle sane. L'infezione viene contratta attraverso gli alimenti o l'acqua ed il sintomo prevalente è la dissenteria; sintomi secondari possono essere febbre, nausea, mal di testa e dolori addominali. Il malessere inizia, solitamente, 2–5 giorni dopo l'ingestione del microrganismo e gli effetti, che possono durare anche 10 giorni, sono molto debilitanti. [10]

Recentemente è stata portata a termine la mappatura genetica completa di *Campylobacter spp.* e scienziati di tre centri in Inghilterra stanno ora lavorando intensamente per capire la funzionalità di ogni singolo gene. Un filone di indagine si occupa dell'attività dei geni di *C. jejuni* e sulla qualità e quantità delle proteine da esso prodotte, a seconda dei vari tipi sollecitazioni ambientali. Ad esempio, si potrà vedere in che modo *C. jejuni* reagisce a variazioni di temperatura, a disponibilità di pochi nutrienti e a diversi livelli di acidità e di sali biliari. I risultati serviranno per capire come faccia a sopravvivere in ambienti così diversi come l'acqua, la carne cruda e l'intestino umano e, al tempo stesso, suggeriranno possibili strategie per prevenire il suo sviluppo negli alimenti. I geni che verranno ritenuti i maggiori responsabili della virulenza di *C. jejuni* saranno studiati più approfonditamente, per esempio analizzando come varia la loro attività in seguito a cambiamenti nella sequenza genetica (mutazioni).

Per ottenere questo genere di informazioni si usano le cosiddette micromatrici o microfotogrammi di DNA: si tratta di vetrini da microscopio trattati in modo particolare su cui è stampata la sequenza completa dei 1700 geni di *Campylobacter*. Quando un estratto organico contenente cellule di *Campylobacter spp* viene posto a contatto con i vetrini, i geni delle cellule che sono attivi in quel momento vengono evidenziati e quindi identificati. Questo è un modo rapido, economico ed efficiente

per confrontare l'attività di geni provenienti da cellule cresciute in condizioni differenti.

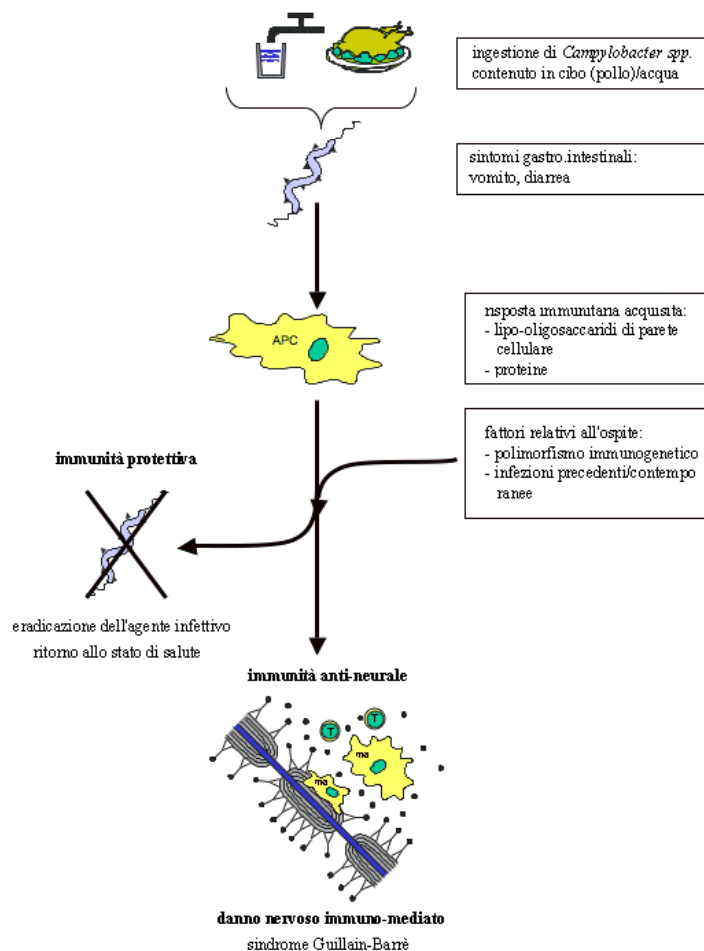
Da queste ricerche emergono già dei dati interessanti: per esempio, *Campylobacter jejuni* possiede una serie di geni cosiddetti di virulenza. D'altra parte sembra che il microorganismo abbia vari geni capaci di codificare per un enzima che provoca modificazioni nella struttura molecolare della membrana batterica. Più di un terzo dei geni responsabili della virulenza, completamente diversi da quelli di altri batteri patogeni, sembra non avere simili conosciuti in natura: ciò autorizza a pensare ad una specifica capacità di infettare di *Campylobacter*, sulla quale non è possibile indagare senza l'aiuto di test basati sul DNA. [10]

#### ***Sindromi cliniche indotte da C. jejuni.***

Le infezioni da *Campylobacter jejuni* si manifestano più comunemente come gravi enteriti con diarrea, malessere, febbre e dolori addominali. I pazienti colpiti possono avere più di dieci scariche diarroiche per giorno durante il picco della malattia e le feci possono essere microscopicamente sanguinolente. La malattia è generalmente autolimitante, tuttavia i sintomi possono perdurare per una settimana e più. Il quadro delle manifestazioni cliniche può includere colite, acuti dolori addominali e batteriemia.

#### ***Diagnosi di laboratorio (esame microscopico).***

*C. jejuni* è sottile (0,3µm) e non può essere osservato facilmente nei campioni colorati con il metodo di Gram. Quando è individuabile, il microorganismo appare come un piccolo batterio ricurvo. Esso, con la sua caratteristica mobilità guizzante, può essere individuato con microscopia a campo scuro o a contrasto di fase nei campioni fecali appena raccolti. [2]



**Fig. n.2:** schema di patogenesi delle malattie indotte dal *Campylobacter jejuni*. (tratto da: <http://www.knol.google.com>)

**Fonte di contagio.**

Il serbatoio dell'infezione è rappresentato principalmente da bovini e polli un certo ruolo viene svolto anche dagli animali da compagnia in particolare cuccioli di cane e gatto, ma anche da suini, pecore, uccelli e roditori.



L'infezione cronica negli animali rappresenta la principale fonte di inquinamento. Si ritiene che buona parte della carne cruda di pollo sia contaminata da *C. jejuni*. La contaminazione del latte avviene principalmente attraverso le feci di vacche portatrici.

Le superfici di lavoro su cui sono state manipolate carni inquinate rappresentano un ulteriore fonte di contagio sia per le persone sia per gli alimenti.

Durante tutto il corso dell'infezione, gli individui non trattati con antibiotici continuano a emettere microrganismi.

### ***Prevenzione.***

Le principali attenzioni da attuare per prevenire il contagio da *Campylobacter spp* sono:

- cuocere in maniera adeguata tutti gli alimenti derivati da fonte animale, in particolare la carne di pollame;
- evitare di contaminare nuovamente gli alimenti dopo la cottura (contatto crudo-cotto);
- sottoporre a pastorizzazione il latte ed a clorazione o bollitura l'acqua destinata al consumo;
- applicare misure igieniche negli allevamenti di polli e nelle fattorie (pulizia, disinfezione, cambio di calzari e abiti) in modo da prevenire la diffusione dell'infezione;
- i cuccioli di cane e gatto affetti da diarrea rappresentano una possibile fonte di trasmissione dell' infezione ai bambini. Il riconoscimento e il controllo dell'infezione da *Campylobacter spp.* negli animali domestici e nei cuccioli in particolare sono da considerare importanti strumenti di prevenzione
- eseguire un accurato lavaggio delle mani dopo ogni contatto con animali, materiale o alimenti potenzialmente infetti. [7]



## 2.4 - TRATTAMENTI PER ELIMINARE *CAMPYLOBACTER* E ALTRI BATTERI DAGLI ALIMENTI

Sono metodi utilizzati per proteggere il cibo da microrganismi, come in questo caso *Campylobacter spp.*, e per consentire il consumo anche non immediato del prodotto. Il cibo conservato deve mantenere aspetto, sapore e consistenza gradevole, come pure, per quanto possibile, il suo valore nutrizionale iniziale. [12]

Le varie tecniche utilizzate si possono distinguere in metodi fisici, metodi chimici e metodi biologici.

### **METODI FISICI**

- TRATTAMENTI TRAMITE CALORE: questi comprendono tecniche, definibili tradizionali, come la pastorizzazione e la sterilizzazione.
  - La pastorizzazione permette l'utilizzo di temperature inferiori ai +100°C. L'obiettivo è quello di eliminare tutti i patogeni non sporigeni e parte dei saprofiti (sino al 99%); essa viene utilizzata per le conservazioni di breve durata.

Si possono distinguere due tipi di pastorizzazione:

- pastorizzazione lenta (+63°C per 30 minuti): questa è sufficiente per eliminare *Campylobacter*, batterio termotrofo che quindi cresce a temperature ottimali di + 42°C fino ad un massimo di 50°C.
- Pastorizzazione rapida: si utilizzano temperature tra i +75°C e +85°C per tempi che vanno da qualche minuto a pochi secondi.

La pastorizzazione viene utilizzata negli alimenti liquidi come latte, birra, vino, succhi di frutta, ecc. Comporta alcuni effetti negativi nell'alimento come: denaturazione delle proteine, caramellizzazione degli zuccheri e distruzione delle vitamine.

- La sterilizzazione consiste nel riscaldamento dell'alimento a temperature maggiori di +100°C. Ha come obiettivo la distruzione di tutti i germi e delle spore contenuti in un alimento, permettendone così una conservazione per lunga durata (teoricamente illimitata). Le comuni modalità di utilizzo prevedono temperature di +120°C per 20 minuti circa. Per alimenti come il latte sono previste temperature di +130°-150°C, per 2-4 secondi (tecnica *Ultra-rapid High Temperature*, U.H.T.), mentre per altri tipi di alimenti (conserve vegetali, alimenti di origine animale) si hanno varie combinazioni tempo-temperatura molto differenti. Per esempio pH <4,5 impedisce lo sviluppo della maggior parte dei batteri compreso *Campylobacter*, eccetto lieviti e muffe facilmente distrutti già a +75°-80°C).
- TRATTAMENTI TRAMITE BASSE TEMPERATURE: questi prevedono tre tipi di tecniche di trattamento che comportano la riduzione/blocco dell'attività microbica ed enzimatica. Esse sono:
  - la refrigerazione che utilizza temperature per la conservazione degli alimenti comprese tra 0°C e +7°C. I tempi di conservazione sono in funzione della deperibilità degli alimenti: pochi giorni per alimenti come latte, formaggi freschi, ortaggi, carni tagliate ecc; alcune settimane per alimenti come carni fresche intere; parecchi mesi per alimenti come pere, mele ecc. L'effetto negativo maggiore è la possibile crescita di muffe.
  - Il congelamento e la surgelazione: il loro meccanismo d'azione comporta la trasformazione dell'acqua presente negli alimenti in cristalli di ghiaccio, con blocco delle attività vitali dei microrganismi.

Ci sono due tipi di congelamento: il congelamento lento che prevede temperature comprese tra i -18°C e -20°C con temperatura a cuore

dell'alimento di  $-5^{\circ}\text{C}$ ; il congelamento rapido con temperature di  $-40^{\circ}$ ,  $-50^{\circ}\text{C}$ , che raggiungono  $-18^{\circ}\text{C}$  a cuore dell'alimento. Tra i due tipi, l'ultimo è quello che ha una maggior efficacia e risulta meno invasivo del congelamento lento, dato che il congelamento lento determina un avanzamento graduale del freddo, inducendo la formazione di cristalli di ghiaccio molto grossi, che vanno a rompere le membrane cellulari con conseguente perdita dei concentrati nutritivi.

La surgelazione è definita come un congelamento rapido in tempo fisso di 4 ore. Essa determina così la formazione di microcristalli di ghiaccio, mantenendo il rispetto delle strutture dell'alimento con conseguente conservazione del valore nutritivo.

Queste ultime tecniche devono essere mantenute lungo tutta la filiera alimentare per il rispetto della cosiddetta catena del freddo, ovvero conservazione dell'alimento a temperature inferiori a  $-18^{\circ}\text{C}$  ininterrottamente fino al momento del consumo. Se rispettate, queste procedure assicurano al consumatore l'inattività più totale dei possibili batteri presenti nell'alimento, compresa quella di *Campylobacter*.

- TRATTAMENTI CHE SOTTRAGGONO L'ACQUA ALL'ALIMENTO: inducono essenzialmente l'essiccamento/disidratazione. Queste tecniche consistono nella sottrazione di acqua dagli alimenti per esposizione all'aria e al sole o attraverso l'utilizzo di impianti industriali come, ad esempio, essiccatoi ad aria calda. Il loro meccanismo d'azione si basa sulla riduzione dell'acqua presente nell'alimento fino ad un complessivo 15-25% in funzione della composizione dell'alimento, con conseguente blocco dell'attività della maggior parte dei microrganismi. In particolare, queste tecniche disattivano

*Campylobacter spp.*, dato che sopravvive solo in  $A_w=0,987$ , sotto alla quale viene completamente inattivato.

Gli alimenti più comunemente essiccati all'aria sono frutti (fichi, prugne, uva ecc) e pesci (merluzzo, che prende la denominazione di stoccafisso, mentre essiccato e salato di baccalà). Esempi invece di prodotti essiccati artificialmente sono paste alimentari secche, latte in polvere, polvere di uova, ecc.

Altro vantaggio dell'essiccamento è che permette di ridurre il volume e il peso dei prodotti.

Un processo utilizzato spesso nelle industrie alimentari è la liofilizzazione, sistema molto efficiente che si compie in due fasi:

1. surgelazione del prodotto;
2. eliminazione della frazione acquosa, per passaggio diretto dalla fase solida (ghiaccio) alla fase gassosa (vapore acqueo), il tutto sotto vuoto mediante a delle pompe ad aria che aspirano tutto il vapore che va a formarsi.

Gli alimenti trattati con la liofilizzazione sono in genere bevande analcoliche, minestre, prodotti vegetali, carni, prodotti per l'infanzia, caffè etc. La liofilizzazione apporta determinate caratteristiche ai prodotti trattati, quali riduzione di peso del 10-25% da quello di partenza, aumento della conservabilità a temperatura ambiente e mantenimento pressoché inalterato del valore nutritivo, grazie ad un processo di essiccazione che non prevede alcun riscaldamento del prodotto.[13]

- IRRADIAZIONI: queste tecniche si possono considerare come la tecnologia odierna nel trattamento degli alimenti.



L'uso di radiazioni ad alta energia per uccidere i microrganismi negli alimenti risale negli Stati Uniti al 1921, quando fu dimostrato che con questo mezzo si potevano eliminare le larve di *Trichina* nella carne di maiale. Utilizzata su scala industriale nel 1943, sempre negli USA, per sterilizzare gli hamburger, è una delle più recenti tecniche introdotte. Essa consiste nel sottoporre gli alimenti all'azione di radiazioni elettromagnetiche come raggi X, raggi gamma e raggi ultravioletti. Questa tecnica è molto discussa perché si teme che renda gli alimenti radioattivi: in realtà le radiazioni ionizzanti non vengono trattenute dagli alimenti e non sono quindi in grado di trasmettersi al consumatore. La dose utilizzata è generalmente da bassa a media e comunque tale da non determinare la formazione di residui radioattivi nei prodotti trattati.

Le radiazioni ionizzanti agiscono determinando la rottura dei legami fra gruppi di atomi che costituiscono le molecole: questo offre la possibilità di inattivare il materiale genetico delle cellule microbiche, inibendone la suddivisione, e di alterare l'attività degli enzimi degradativi presenti negli alimenti, rallentandone quindi il deterioramento.

L'irraggiamento trova quindi applicazione per:

- ridurre la carica microbica di batteri saprofiti in carni, pollame e pesci freschi aumentandone i tempi di conservazione;
- inattivare i batteri patogeni in prodotti deperibili e in alimenti congelati;
- inattivare gli insetti infestanti (inclusi gli stati larvali) e i parassiti;
- inibire la germogliazione dei tuberi e dei bulbi.

Questa metodologia viene utilizzata su:

- carne bovina, pollame, pesce per eliminarne i microrganismi patogeni;

- cereali, riso, alcuni frutti e alcune verdure per eliminare insetti ed altri parassiti;
- alcuni frutti tropicali (es. ananas e banane) per ritardarne la maturazione;
- fragole per ritardarne la marcescenza;
- patate, cipolle, aglio per bloccarne la germinazione;
- cacao, caffè, erbe aromatiche e spezie.

***Sorgenti d'irradiazione e meccanismo d'azione.***

RAGGI GAMMA: sono radiazioni elettromagnetiche ( $\lambda = 10^{-10} \div 10^{-12}$ ) prodotte dal decadimento di nuclei radioattivi, emessi da <sup>137</sup>Cesio o da <sup>60</sup>Cobalto.

Il <sup>60</sup>Cobalto emette radiazioni con energia media pari a 1,25 Mev, ad elevato potere battericida e molto penetranti, che ne rendono l'impiego pericoloso per l'operatore che le utilizza.

Il <sup>137</sup>Cesio ha il duplice svantaggio di emettere radiazioni più deboli del cobalto ed essere idrosolubile costituendo, quindi, un pericolo maggiore per l'ambiente.

Queste sorgenti radioattive sono prodotte nei reattori nucleari commerciali e hanno un'emivita abbastanza lunga; il nucleo è sempre attivo, rendendo necessaria una idonea schermatura per impedire la dispersione di radiazioni nell'ambiente e/o a persone che si trovino nelle immediate vicinanze. Quando le sorgenti radioattive non sono in uso, esse vengono conservate in vasche d'acqua che assorbono tutte le radiazioni, se l'acqua contenuta nelle apposite vasche non verrà più utilizzata, subirà un processo di demineralizzazione e decontaminazione, in modo da non essere così una possibile fonte d'inquinamento.

I raggi gamma possono penetrare in profondità nei tessuti, rendendo possibile il trattamento di grosse quantità di prodotti, che vengono introdotti in camere dotate di spessa schermatura.

IRRADIAZIONE CON FASCI DI ELETTRONI O RAGGI BETA: sono fasci di elettroni ad alta energia non di natura elettromagnetica ma accelerati ad alta velocità da acceleratori di elettroni, che sfruttano la stessa tecnologia del tubo catodico del televisore, anche se molto più potente.

Una sottile schermatura metallica è sufficiente ad impedire che gli elettroni fuoriescano dalla camera di trattamento. Quando la sorgente di elettroni non viene usata, è sufficiente spegnere la macchina per inattivarla. Non c'è presenza di materiale radioattivo.

I fasci di elettroni sono meno penetranti dei raggi gamma: diffondono nei prodotti alimentari solo per pochi centimetri; essi trovano, quindi, impiego per alimenti confezionati, come i filetti di pesce, a patto che le confezioni non siano spesse più di 8-10 cm e che l'alimento non abbia densità superiore a  $1\text{g/cm}^3$ .

RAGGI X: questa tecnologia è la più recente e combina le proprietà delle due precedenti. Raggi X ad alta energia possono essere prodotti quando un fascio di elettroni incide su un sottile foglio di metallo. Le sorgenti di raggi X possono essere accese e spente e non necessitano di materiale radioattivo. I raggi X hanno effetto e potere di penetrazione simile a quello dei raggi gamma ma sono poco utilizzati per lo scarso rendimento delle apparecchiature che li emettono.

Il funzionamento dei raggi X e dei raggi gamma si fonda sul cosiddetto "principio di diffusione di Compton": un fotone colpendo un atomo trasferisce a questo la propria energia, determinando il distacco di un elettrone dall'orbitale più esterno e formando così uno ione; gli elettroni così liberatisi (elettroni Compton) inducono la ionizzazione di altri atomi vicini (effetto primario). La formazione di radicali liberi dovuti alla ionizzazione di atomi e molecole porta a lievi ma importanti modifiche della struttura chimica di un alimento. La principale reazione primaria è la radiolisi

dell'acqua che porta alla formazione di varie particelle, tutte cariche elettricamente e quindi in grado di interagire con le molecole di substrato. I radicali liberi, i cationi e gli anioni che si producono in seguito a queste reazioni primarie sono molto reattivi e possono interagire fra loro o con i costituenti di un alimento.

Tra i prodotti della radiolisi dell'acqua il radicale idrossilico ( $\cdot\text{OH}$ ) è un potente ossidante, agisce sui composti insaturi forniti di doppi legami, quali gli acidi grassi poliinsaturi; sugli acidi nucleici del genoma cellulare può indurre la rottura di parte della catena. Gli elettroni idrati agiscono per lo più con composti aromatici, acidi carbossilici, chetoni, aldeidi, e tioli presenti nell'alimento. Gli atomi di idrogeno reagiscono per la rottura dei ponti idrogeno delle molecole o si aggregano a composti olefinici.

La reattività dei radicali liberi dipende dalla loro diffusione nel mezzo, che a sua volta dipende dalla percentuale di acqua libera presente nel prodotto. Ne deriva un concetto fondamentale: più sono bassi i valori di acqua libera in un alimento e minore è l'azione chimica dei radicali ossidanti. Di conseguenza negli alimenti disidratati o congelati è minore la diffusione dei radicali e molto più limitati, quindi, gli effetti delle radiazioni ionizzanti rispetto agli alimenti freschi. Ciò vale tanto per gli aspetti positivi delle radiazioni quanto per quelli indesiderati. [4]

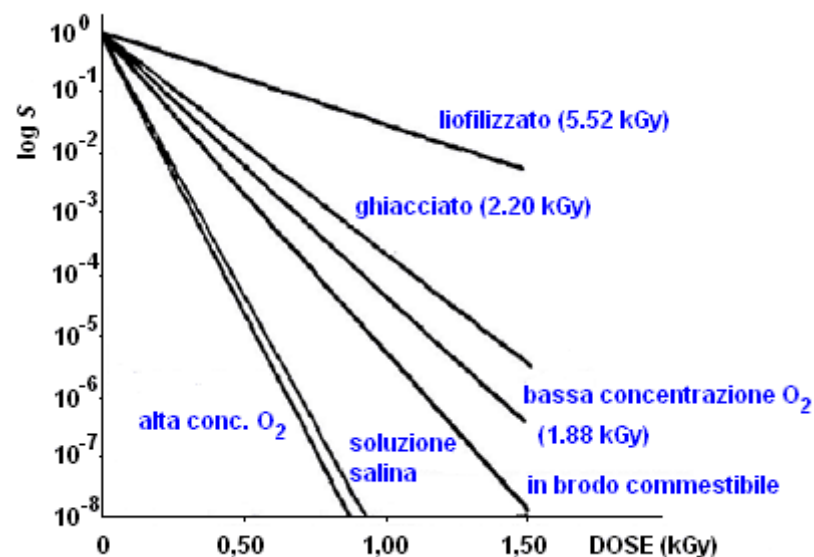
Il meccanismo con cui le radiazioni distruggono i microrganismi è legato al danno causato al DNA. La frazione di sopravvivenza, ( $S$ ), alle radiazioni è un fattore fondamentale nei processi biologici ed è esprimibile con l'equazione statistica di Poisson:

$$S = \exp(-K D);$$

dove:  $D$  è la dose assorbita,  $K$  è la probabilità per unità di dose, che la radiazione interagisca con il DNA per produrre una lesione letale.

Il valore di  $K$  rappresenta la sensibilità alla radiazione dei microrganismi: esso dipende dalla quantità di DNA presente nel nucleo cellulare, dal metodo di sterilizzazione, dal tipo di microrganismo e dal tipo di ambiente.

Ad esempio, nel diagramma sottostante (Fonte: Infn) sono mostrate le curve di sopravvivenza di *Salmonella* Ty2 in diversi ambienti. Si osserva che la dose di radiazione per ridurre a  $10^{-8}$  la popolazione di questo batterio in una soluzione salina, ad esempio, è minore di 1kGy, mentre se il batterio è congelato o liofilizzato le dosi sono rispettivamente 2.20 e 5.52kGy.



**Fig. n.X:** diagramma semilogaritmico dell'eq.ne di *Poisson*:  
 $\log S = - K D$ . [4]

Il processo di sterilizzazione è anche fortemente influenzato dalla diversa sensibilità dei vari ceppi di microrganismi e dalle condizioni di irraggiamento.

Gli effetti secondari delle radiazioni sono rappresentati dal combinarsi dei radicali liberi con altre molecole, dalla formazione di dimeri e dalla cattura di elettroni da parte di ioni positivi. Studi chimici hanno dimostrato che gli effetti delle radiazioni sono direttamente proporzionali alla dose utilizzata.

### ***Le buone pratiche di irraggiamento.***

In sede di autocontrollo igienico e sanitario, che per legge va attuato in ogni industria alimentare, la prevenzione di pericolosi inquinanti microbici o chimici degli alimenti dipende quasi esclusivamente dalla corretta applicazione delle buone prassi di lavorazione. Laddove la UE giunga a permettere l'uso delle radiazioni è inevitabile che il proprietario dello stabilimento o chi per esso dovrà prevedere anche delle buone pratiche di irraggiamento.

Per agire in modo corretto, l'intervallo di dose radioattiva che si potrà impiegare dovrà essere quanto più vicino possibile a quello tecnicamente fattibile.

Al momento si impiegano dosi che arrivano ad un massimo di 10kGy, nel rispetto di quanto consigliato dalla commissione di esperti sull'irraggiamento degli alimenti. Sulla base di queste conclusioni la Commissione del *Codex Alimentarius* ha messo a punto opportuni standard generali per gli alimenti irradiati e delle linee guida per le operazioni di irraggiamento da applicare nel trattamento degli alimenti. In base a quanto stabilito in questi due documenti, la dose massima di irraggiamento consigliata per gli alimenti deve essere tale per cui meno del 2,5% del prodotto trattato assorba dosi di radiazioni superiori a 15kGy.

Nel caso di impiego di raggi gamma, la quantità di ossigeno che diffonde nella trama dell'alimento è superiore a quella che viene consumata dalle reazioni indotte dalle radiazioni stesse. L'inverso capita, invece, se si utilizzano i fasci di elettroni. Essendo questi ultimi dotati di una maggiore velocità di penetrazione, la quantità di ossigeno che viene consumata è maggiore di quella che dipende dall'esterno dell'alimento. Siamo quindi di fronte a due condizioni differenti. Assodato che l'ossigeno favorisce indirettamente la formazione di radicali ossigenati molto attivi,

se ne conclude che esso è in grado di compromettere in maniera cospicua le caratteristiche sensoriali del prodotto irraggiato. [4]

***Effetto delle radiazioni sui microrganismi.***

Le radiazioni agiscono sui microrganismi danneggiando il DNA, provocandone rotture o altre modificazioni che impediscono la crescita o la riproduzione dei batteri. Le forme viventi più complesse sono danneggiate da dosi più basse rispetto alle forme più semplici; quindi, con una dose inferiore a 0,1kGy uccide insetti e parassiti e impedisce alle piante di germogliare. Una dose fra 1,5 e 4,5kGy uccide la maggior parte dei batteri patogeni, escluse le spore. Una dose più alta, fra 10 e 45kGy, inattiva le spore e alcuni virus. I prioni, che non contengono acidi nucleici, sono difficili da inattivare con le radiazioni. La dose letale per l'uomo è di 4Gy. La dose necessaria per trattare un alimento varia a seconda dell'alimento e del patogeno bersaglio. In genere è necessaria una dose più alta per uccidere lo stesso numero di organismi in un cibo congelato rispetto ad uno refrigerato. Si definisce “D-dose” l'entità dell'irradiazione richiesta per distruggere il 90% degli organismi, cioè per abbassarne la concentrazione di 1 logaritmo decimale.

<b>Patogeni</b>	<b>D-dose in kGray</b>
<i>Campylobacter</i>	0,20
<i>Toxoplasma</i> (cisti)	0,25
<i>E. coli</i> O157	0,30
<i>Listeria</i>	0,45
<i>Salmonella</i>	0,70
<i>C. botulinum</i> (spore)	3,60

**Tab. n.6:** D-dose (entità dell'irradiazione richiesta per distruggere il 90% degli organismi) in kGy per patogeni selezionati, a temperatura di refrigerazione. [11]

L'effetto dell'irradiazione sulle caratteristiche organolettiche dei cibi è solitamente minimo per dosi fino a 7,5kGy. Gli alimenti non diventano radioattivi, tuttavia non sempre sopportano l'irradiazione senza modificazioni della qualità. Le carni ad elevato contenuto di grasso possono sviluppare odori sgradevoli; l'albume d'uovo può diventare lattescente e liquido; le ostriche irradiate possono morire e questo accorcia sostanzialmente la loro vita commerciale.

Gli effetti nutrizionali dell'irradiazione sono stati studiati a fondo e sono limitati ad una modesta diminuzione di alcune vitamine, tiamina in particolare, e alla produzione di radicali liberi ossidanti, che reagiscono quasi immediatamente nel cibo e quindi non persistono. Non sono stati osservati effetti negativi in animali da esperimento alimentati con cibi irradiati, né in volontari umani.

#### ***Alimenti candidati all'irradiazione.***

Sulla base delle conoscenze epidemiologiche concernenti le modalità di trasmissione dei più importanti patogeni alimentari, i principali alimenti candidati all'irradiazione sono carne tritata, per distruggere *E. coli* 0157, carne di pollo, per eliminare *Campylobacter spp.*, carne bovina e di pollo, per eliminare *Salmonella spp.*, carni confezionate pronte al consumo (*hot dogs*) per eliminare *Listeria spp.*, carni di maiale, per eliminare *Toxoplasma spp.*

#### ***Benefici potenziali dell'irradiazione di carne e pollame.***

Se si ipotizza di irradiare il 50% delle carni bovine, di pollo, maiale e delle carni lavorate, si possono stimare i potenziali benefici dell'irradiazione con semplici calcoli. Assumendo che questi cibi siano la fonte del 50% delle infezioni alimentari da *Salmonella spp*, *E. coli*, *Campylobacter spp*, *Listeria spp* e *Toxoplasma spp*, i potenziali benefici dell'irradiazione sarebbero rappresentati da una riduzione del 25% nella morbilità e mortalità per queste infezioni. [11]



Patogeno	Casi	Ricoveri	Morti
<i>E. coli</i> O157	23.000	700	20
<i>Campylobacter</i>	500.000	2.600	25
<i>Salmonella</i>	330.000	4.000	140
<i>Listeria</i>	625	575	125
<i>Toxoplasma</i>	28.000	625	94
Totale	881.625	8.500	404*

**Tab. n.7:** Numero potenziale di problemi sanitari evitabili annualmente negli Stati Uniti con l'irradiazione del 50% di carni e pollame. [11]

### **METODI CHIMICI**

Prevedono principalmente due modalità di utilizzo e cioè aggiunta di sostanze conservanti naturali e aggiunta di additivi chimici.

- **SOSTANZE NATURALI**
  - Sale: ha un effetto disidratante che avviene per osmosi, con soluzioni saline concentrate tra il 15% e il 25% (salamoie), a seconda del tipo di alimento, comportando il blocco delle attività enzimatiche. Non efficientissima come tecnica, dato che alcuni batteri resistono in salamoie al 25% di sale. Richiede tempi di conservazione abbastanza lunghi a temperatura ambiente.
  - Zucchero: ha un'azione analoga al sale, utilizzato in concentrazione tra il 60% e il 65% in alimenti come marmellate, sciroppi etc.
  - Aceto: comporta un'elevata acidità, dovuta alla presenza dell'acido acetico, creando di conseguenza un ambiente sfavorevole allo sviluppo dei microrganismi esplicando un'azione antisettica.
  - Oli e grassi: creano un ambiente sfavorevole per lo sviluppo dei batteri, dei lieviti e delle muffe dovuto a dei fattori che creano degli ostacoli non

permettendo gli scambi di ossigeno (O<sub>2</sub>). Gli alimenti, prima di essere immersi nell'olio, vengono sottoposti a sterilizzazione per eliminare le possibili forme vegetative presenti.

- Alcol etilico: ha un'elevato potere antisettico. [13]
- Fumo: utilizzato da centinaia di anni per conservare a lungo carni, pesci e alcuni formaggi, oltre a conferire sapori e aromi particolari. L'alimento viene esposto all'azione combinata del calore e del fumo sprigionato dalla combustione incompleta di legni particolari, soprattutto faggio, quercia e castagno. Il fumo è composto da una fase gassosa, contenente molte sostanze volatili responsabili della conservazione e dell'aroma conferito all'alimento, e da una fase solida contenente sostanze indesiderate come gli idrocarburi policiclici aromatici, noti cancerogeni. L'azione del fumo è dovuta alla temperatura, alla disidratazione, all'ambiente povero di ossigeno e all'azione antibatterica specifica di alcune sostanze presenti, prima fra tutte l'aldeide formica. I fattori che influenzano la velocità di penetrazione del fumo all'interno dell'alimento sono molti, ma tutti portano ad affermare che più il trattamento è lento e a bassa temperatura, migliore è il risultato. Un buon affumicamento, quindi, può durare anche qualche giorno. Le leggi italiane consentono l'utilizzo di aromatizzanti di affumicatura, che "simulano" l'affumicatura. Essi hanno il vantaggio di limitare al minimo le quantità di idrocarburi aromatici cancerogeni, anche se il risultato finale non è lo stesso dell'affumicatura naturale di qualità. [14]

Additivi: qualsiasi sostanza non utilizzata come ingrediente tipico dell'alimento, aggiunta al prodotto con un fine tecnologico (colorare, aromatizzare, conservare etc) nella fase di produzione, trasformazione o

preparazione. Sono moltissimi; di seguito un piccolo elenco degli additivi utilizzati nelle produzioni alimentari:

coloranti; conservanti; antiossidanti; addensanti; esaltatori di sapidità; edulcoranti; emulsionanti sali di fusione; gelificanti; stabilizzanti; acidificanti; correttori di acidità; antiagglomeranti; amidi modificati; agenti lievitanti; antischiumogeni; agenti di rivestimento; agenti di trattamento della farina; agenti di resistenza; umidificanti; sequestranti; enzimi; agenti di carica; gas propulsore e di imballaggio.

***METODI BIOLOGICI:*** questi sfruttano la presenza di specie di microrganismi in grado di determinare modificazioni sulle caratteristiche chimiche, nutrizionali ed organolettiche degli alimenti. Ciò avviene attraverso le fermentazioni, che possono essere:

- **Alcolica:** che comporta la trasformazione degli zuccheri semplici in alcool etilico ad opera dell'attività vitale dei saccaromiceti appartenenti al gruppo dei lieviti; utilizzata soprattutto nelle bevande alcoliche.
- **Fermentazione acetica:** che prevede la trasformazione dell'alcol etilico del vino in acido acetico (aceto).
- **Fermentazione lattica:** prevede la trasformazione da parte dei bacilli lattici o lattobacilli, del lattosio in acido lattico il quale esplica un'azione battericida. Utilizzata per es nella produzione dello yogurt. [13]

## ***IL MAP: CONFEZIONAMENTO IN ATMOSFERA MODIFICATA***

Le tecnologie di conservazione dei prodotti alimentari devono rispondere a due esigenze sempre più sentite: prolungare la vita del prodotto e ridurre gli additivi utilizzati.

Il confezionamento in atmosfera modificata soddisfa entrambe queste esigenze. Il sistema consiste nel modificare l'atmosfera che circonda il prodotto alimentare all'interno della confezione. In questo modo si riesce a controllare le reazioni chimiche, enzimatiche e microbiologiche, riducendo o eliminando così le degradazioni principali. Rispetto alle tecniche più tradizionali (in aria o sottovuoto), il confezionamento in atmosfera modificata (MAP) offre un'eccellente garanzia per una totale conservazione del prodotto alimentare. In relazione al tipo di prodotto, l'atmosfera modificata utilizza specifici gas o miscele di gas, con proprietà diverse. Il confezionamento in M.A.P. presenta numerose forme di applicazione e copre una vasta gamma di prodotti: carni e insaccati, prodotti da forno, cibi precotti, formaggi, latte in polvere, caffè, succo di frutta, vino, patatine e salatini, frutta secca, ecc. Molteplici e significativi sono i vantaggi del confezionamento in M.A.P:

- allungamento della durata di conservazione consente di sfruttare le economie di scala di produzione, di ottimizzare la gestione delle scorte e i costi di trasporto, di estendersi sui mercati esteri, di massimizzare il ritorno e minimizzare le perdite, ecc.;
- sicurezza di un imballaggio concepito secondo le più rigorose norme igieniche, che garantisca la massima qualità del prodotto senza però compromettere l'estetica della presentazione;

- praticità ed economia: dal punto di vista operativo, questa tecnica viene sviluppata tramite l'utilizzo di una confezionatrice con alcuni accorgimenti tecnici importanti;
- permette di ridurre in misura consistente l'uso di additivi e conservanti.

In funzione delle caratteristiche dei prodotti e delle forme d'imballaggio, i procedimenti di confezionamento in M.A.P. sono sostanzialmente di due tipi:

1. a "lavaggio" di gas: la macchina confezionatrice (verticale o orizzontale) forma un tubo continuo di materiale d'incarto in cui viene introdotto il gas che sostituisce l'aria presente nella confezione.
2. Vuoto compensato. Il *packaging* ha molte funzioni complementari: dalla protezione del prodotto da agenti inquinanti esterni, alla valorizzazione del medesimo in termini di marketing, alla informazione per il cliente sulle modalità d'uso e sugli ingredienti.

E' importante sottolineare che il confezionamento in M.A. di per sè non garantisce l'effetto desiderato o almeno non nella misura attesa se l'alimento non viene confezionato batteriologicamente puro. Si possono invece moltiplicare gli effetti del gas sul prodotto se si adottano accorgimenti igienici e di controllo adeguati, che permettano all'alimento di giungere in fase di confezionamento con una limitata carica batterica. Ne deriva quindi che, in funzione della durata che si vuole ottenere per il prodotto, è indispensabile sanificare il più possibile l'ambiente di lavoro e gli impianti di produzione, controllare l'aria in ingresso negli stabilimenti e non da ultimo gli ingredienti che costituiscono l'alimento. E' indispensabile poi introdurre severe norme igieniche per il personale a contatto diretto con la produzione. Prolungare i periodi di conservazione significa prima di tutto produrre un alimento che si presti genericamente al trattamento con

gas,garantendo quindi la riuscita del confezionamento MAP, per poter beneficiare dei notevoli vantaggi derivati. [15]

## CAP. 3 - SINDROME DI GUILLAIN-BARRÉ

*Enrico Fabrin, Alberto Zancanaro*

Con la sigla GBS si indica l'abbreviazione di *Guillain-Barré Sindrome* (sindrome di Guillain-Barré): in termini medici si tratta di una poliradicolopatia infiammatoria demielinizzante acuta (AIDP). AIDP è il sottotipo più frequente di GBS in Nord America ed in Europa e rappresenta il 90% dei casi di GBS, mentre in Asia, Centro e Sud America, la forma assonale di GBS (AMAN, AMSAN; v. oltre, pag.67-70) costituisce dal 30% al 47% dei casi, mentre in Nord America ed in Europa solo il 5-10%.

Fu nel 1856 che il medico francese Jean Landry descrisse per primo una malattia, in seguito denominata "paralisi ascendente di Landry", ma fu solo negli anni 1914-1918 che tre giovani medici francesi, specializzandi in neurologia (George Charles Guillain, Jean Alexandre Barré e André Strohl), ebbero modo di esaminare due soldati paralizzati e di condurre accertamenti sulle caratteristiche del *liquor* cerebrale e spinale, cercando di trovare cause e rimedi di quella strana, inusuale e apparentemente inspiegabile patologia. Dall'esaminazione dei due soldati trovarono e descrissero le principali caratteristiche cliniche della malattia:

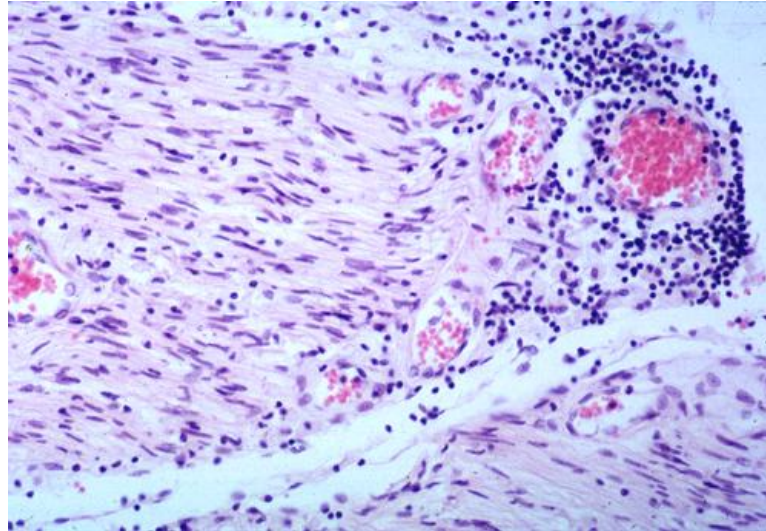
- IPOSTENIA e ASTENIA: ci si riferisce a un quadro sintomatico che potremmo riassumere col termine di spossatezza o facile stancabilità. Non c'è posizione del corpo, sdraiato, seduto, inclinato, coricato su un fianco, che riesca ad agevolare il riposo e a mitigare il fastidio, spesso intenso fino al dolore. Questo malessere si contrasta abbastanza bene con i farmaci antalgici uniti alle benzodiazepine, avendo cura di non eccedere con queste ultime, a causa del loro ben noto effetto

miorilassante che andrebbe invece evitato per non favorire ulteriormente l'addormentamento dei muscoli.

- AREFLESSIA: si intende la mancanza assoluta di riflessi.
- DISESTESIE, PARESTESIE con lievi IPOESTESIA: sono abnormi sensazioni che il cervello percepisce dalle terminazioni nervose periferiche, e sono prevalentemente, ma non esclusivamente, riferite a mani e piedi. Si parla di disestesia quando è presente dolore, di parestesia in caso di sensibilità alterata da percezioni di tipo statico o dinamico per lo più sgradevoli e a volte insopportabili, di ipoestesia in caso di sensibilità ridotta.
- IPERPROTEINORRACHIA in assenza di cellule (dissociazione albumino-citologica).

Osservando queste caratteristiche cliniche Guillain, Barré e Strohl descrissero la GBS come una poliradicolonevrite, cioè una malattia che coinvolge le radici dei nervi, laddove questi si diramano dalle spine vertebrali per ramificarsi nei diversi organi periferici, che si manifesta in forma acuta, cioè si sviluppa entro pochi giorni dalla comparsa dei primi sintomi. Si osservano, lungo il decorso dei nervi periferici, aree focali di demielinizzazione segmentale con infiltrati perivascolari ed endoneurali di linfociti e monociti; tali aree si trovano anche a carico delle radici e degli stessi nervi cranici. Nei casi più gravi è presente anche la degenerazione dell'assone e, in alcuni pazienti, l'anomalia primitiva consiste in una degenerazione assonale precoce piuttosto che in una demielinizzazione. La malattia può evolvere fino a peggiorare in modo grave nel corso di alcune settimane (solitamente non oltre le 4) e poi, sebbene lentamente, lasciare spazio al recupero fino alla pressoché completa guarigione; la GBS è una malattia autolimitante, con recupero nell'arco di





**Fig. n.4:** immagine istologica delle lesioni tipiche di GBS a livello di sistema nervoso centrale; EE, 100x. (da: <http://www.neuropathology.neucom.edu>)

un paio di mesi. La sua causa è tuttora in parte ignota, ma si ritiene in molti casi autoimmune [16]. La malattia è spesso correlata a infezioni di origine batterica o virale. La responsabilità principale delle infezioni di origine batterica è senza dubbio del *Campylobacter jejuni* e la risposta immunitaria che ne consegue (ossia la produzione di anticorpi) investe il sistema nervoso periferico dell'ospite, causando una paralisi progressiva e ascendente, dagli arti inferiori a quelli superiori [17]. Il *Campylobacter jejuni* inoltre, provoca le forme di GBS più gravi. Esso appartiene alla famiglia delle *Campylobacteriaceae*, genere *Arcobacter*. E' un bacillo Gram-negativo, incurvato ad "S" o spirale, molto mobile per la presenza di uno o due flagelli polari, microaerofilo, capaci di produrre citotossine che, anche con una ridotta carica infettante (400-500 batteri), sono in grado di provocare gastroenteriti con sangue nelle feci, diarrea e febbre. E' importante sia ricordare l'affinità che possiede il *Campylobacter* per la sfigomieline, fosfatidilcolina, nonché per il

collagene, sia l'attività tossica svolta dalle sue enterotossine alterante il citoscheletro. (v. cap. 2, pag 29-33). [17]

Nel 90% dei pazienti, il deficit di forza è massimo alla 3<sup>a</sup> settimana. La debolezza è sempre più evidente dei sintomi di tipo sensitivo ed è più frequente, inizialmente, a livello prossimale. C'è anche una perdita dei riflessi tendinei profondi. I muscoli sfinterici sono di solito risparmiati. Più del 50% dei pazienti con gravi quadri presenta debolezza muscolare a livello facciale e orofaringeo e circa il 5-10% deve essere intubato a causa dell'insufficienza respiratoria; in tali pazienti, inoltre, sono spesso presenti alterazioni neurovegetative (come fluttuazioni della pressione arteriosa), anomalie della secrezione di vasopressina o ormone antidiuretico (*Anti Diuretic Hormone*, ADH), aritmie cardiache, modificazioni pupillari. La paralisi respiratoria e le modificazioni neurovegetative possono esporre il paziente a pericolo di vita. Secondo uno studio, effettuato da Hughes e Cornblath nel 2005 e dello stesso Hughes nel 2007, è indicata una percentuale di decessi, per questa patologia, che oscilla tra il 4% ed il 15% ed il 20% dei colpiti presenta disabilità dopo un anno dalla comparsa della sindrome. Un ciclo di fisioterapia, di solito, è utile per recuperare appieno la funzionalità degli arti.

In un'insolita variante è presente soltanto oftalmoparesi, atassia e areflessia. La *miastenia gravis*, la carenza acuta di tiamina e, raramente, il botulismo devono essere esclusi. [16]



**Fig. n.5:** schema illustrativo delle tappe fondamentali nell'insorgenza della GBS. [16]

### 3.1 - CLASSIFICAZIONE DELLE NEUROPATIE

Neuropatia è qualsiasi processo patologico che colpisce un nervo.

Una neuropatia dà sintomi e/o segni di malattia se ostacola il passaggio d'informazioni dal cervello ai muscoli striati e lisci (veicolate dalle fibre motorie e vegetative) e dalla periferia (cioè da cute, articolazioni, tendini, muscoli, visceri, ecc) al centro (fibre sensitive).

Le neuropatie possono interessare un solo nervo o radice o plesso (mononeuropatie) oppure essere diffuse e simmetriche e, tranne poche eccezioni, coinvolgere le fibre più lunghe, cioè quelle destinate ai segmenti distali degli arti in misura maggiore rispetto a quelle per i distretti prossimali (polineuropatie).

Le polineuropatie possono essere dovute a svariate cause, per cui si distinguono in: genetiche, tossiche, carenziali, infiammatorie, infettive, ecc. [18]

Nell'ambito delle neuropatie genetiche si distinguono forme degenerative e forme metaboliche, ciascuna delle quali può essere a difetto genetico noto o ignoto. Nel caso in cui il gene responsabile non sia ancora stato identificato, è noto perlomeno il *locus* in alcuni casi, cioè il sito su un determinato cromosoma in cui risiede il gene; spesso, invece, non è noto neppure il *locus*. Le neuropatie genetiche si distinguono, in base alle fibre nervose selettivamente o prevalentemente coinvolte, in tre gruppi:

**a. Neuropatie sensitivo-motorie**, cioè forme in cui sono alterate sia le fibre motorie sia quelle sensitive per un'alterazione metabolica o per un processo degenerativo.

La forma detta Charcot-Maie-Tooth (CMT) si colloca in questo gruppo tra le forme degenerative, ma non ne rappresenta tutte le forme, bensì solo quelle in cui la neuropatia costituisce l'aspetto principale o unico della malattia. Pertanto non si può ascrivere CMT tra le neuropatie sensitivo-motorie, che fa parte di un quadro di degenerazione multisistemica del sistema nervoso, come accade nell'atassia spino-cerebellare (morbo di *Friedreich*), nè si dovrebbe chiamare CMT la neuropatia sensitivo-motoria, generalmente lieve, che si osserva in alcuni casi di paraplegia spastica ereditaria; anche se Dyck ha denominato quest'ultima CMT 5, in quanto i problemi e il trattamento riabilitativo sono nettamente differenti da quelli dei pazienti con CMT pura. Invece, le neuropatie sensitivo-motorie di tipo degenerativo, associate a minimi segni d'interessamento del sistema nervoso centrale ma che non influenzano sostanzialmente il quadro clinico e quindi il trattamento riabilitativo, dovrebbero essere indicate come CMT-*plus*, come peraltro già suggerito da altri autori, in attesa di una loro collocazione migliore. [18] Infine, è molto importante differenziare la CMT dalle neuropatie metaboliche, come ad esempio la neuropatia

amiloidosica familiare, in quanto alcune di queste ultime possono giovare di un trattamento (trapianto di fegato) che ne arresta la progressione.

**b. Neuropatie motorie:** cioè forme in cui sono alterate solo le fibre motorie, verosimilmente per degenerazione dei motoneuroni spinali con l'assone più lungo, cioè quelli che inviano l'impulso ai muscoli più distanti dal centro del corpo.

Queste forme sono spesso chiamate CMT spinale anche se non corrispondono alla definizione di CMT (neuropatia sensitivo-motoria) nè probabilmente sono neuropatie, ma neuronopatie: esse, infatti sono varianti dell'atrofia muscolare spinale (*Distal Spinal Muscular Atrophy*, SMA distale o dSMA). La dSMA, detta anche neuropatia motoria ereditaria (*Hereditary Motory Neuropathy* HMN), si distingue clinicamente dalla CMT perchè l'indebolimento che provoca predilige muscoli differenti, in particolare il tricipite surale.

**c. Neuropatie sensitive ed autonome:** sono forme molto rare in cui sono alterate le fibre sensitive e quelle del sistema neurovegetativo, per cui i pazienti vanno incontro ad ulcerazioni, mutilazioni e fratture (per mancanza di sensibilità dolorifica), a ipotensione ortostatica, ridotta sudorazione e assenza di lacrimazione.

Nel 1968 Dyck distinse sette tipi di neuropatia sensitivo-motoria ereditaria (*Hereditary Motor Sensory Neuropathy*, HMSN), dette anche CMT, in base alle conoscenze dell'epoca:

- **Tipo 1:** forme demielinizzanti, individuate in base alla velocità di conduzione motoria (VCM) del nervo mediano uguale o inferiore a 38 m/sec, ad ereditarietà autosomica dominante (maggioranza dei casi) o recessiva o legata al sesso.
- **Tipo 2:** forme assonali, individuate in base a VCM maggiore di 38 m/sec, ad ereditarietà come la tipo 1.
- **Tipo 3:** forma demielinizzante grave, sia perché con VCM molto bassa (inferiore o uguale a 12 m/sec), sia perché l'esordio avviene entro i primi due anni di vita; inoltre, si osservano *deficit* motori gravi, spesso estesi anche prossimalmente, nonché atassia e malformazioni scheletriche gravi (piede cavo e scoliosi); questa forma è meglio conosciuta come sindrome di Dejerine-Sottas (DSS).
- **Tipo 4:** forma demielinizzante, che successivamente si è scoperto essere dovuta ad accumulo di acido fitanico in vari organi (cute, retina, cuore, cervelletto, ecc), per cui è stata tolta dalla classificazione delle CMT e inquadrata tra le neuropatie metaboliche come morbo di Refsum.
- **Tipo 5:** forme in cui si associa un interessamento delle vie piramidali, con conseguente spasticità che si aggiunge alla neuropatia sensitivo-motoria.
- **Tipo 6:** forma associate ad atrofia ottica.
- **Tipo 7:** forma associata a degenerazione pigmentaria della retina.

Con il progredire delle conoscenze, questa classificazione è stata notevolmente sconvolta. Innanzitutto il posto liberato dal morbo di Refsum è stato occupato dalle rare forme autosomiche recessive, demielinizzanti o assonali o solo demielinizzanti, che sono state denominate CMT 4. Poi, l'identificazione dei *loci* (cioè della localizzazione di ciascun gene su un determinato cromosoma, effettuata studiando

famiglie con numerosi membri affetti in più generazioni) e dei geni responsabili di CMT ha permesso non solo di identificare numerosi sottotipi, ma ha anche messo in discussione i criteri su cui questa classificazione era basata, cioè sul tipo di trasmissione ereditaria e la differenziazione tra forme demielinizzanti e forme assonali in base alla VCM del nervo mediano. Ad esempio, si è visto che l'alterazione di uno stesso gene, responsabile della formazione di una proteina mielinica, può dare sia forme classificate come demielinizzanti, in base al criterio della VCM, sia forme assonali. Questo è quanto succede in caso di alterazione della proteina P0, che è responsabile sia della CMT 1B sia, secondo la *Washington University*, della CMT 2-P0. Ciò si spiega facilmente se pensiamo che, a seconda della mutazione del gene della P0, si forma una proteina P0 di differente funzionalità: se la P0 sarà poco alterata rispetto al normale, non causerà la morte di molti assoni, anche se la VCM sarà rallentata perchè la mielina è alterata; se invece la P0 sarà molto alterata o tale da alterare chimicamente anche le molecole di P0 sane prodotte dall'altro gene, causerà la morte di molti assoni. Pertanto, si inizia a parlare di "Sindromi P0", in cui ad ogni gruppo di mutazioni corrisponde un fenotipo differente (CMT 1B, CMT 2-P0, neuropatia ipomielinizzante congenita, DSS, neuropatia responsiva agli steroidi).

Anche un'alterazione del gene della connessina 32 (Cx32), responsabile della CMT X, può dare sia casi con VCM maggiore sia casi con VCM minore di 38 m/sec.

Inoltre sono stati recentemente identificati due loci associati a CMT con velocità di conduzione intermedia, cioè tra 25 e 50 m/sec, entrambi a trasmissione dominante: 19p12-p13.2 e 10q24.1-q25.1.

Per quanto riguarda il criterio della trasmissione ereditaria, si è visto che anch'esso può generare confusione nella classificazione.

Un esempio è dato dalle mutazioni del gene EGR2: alcune causano la malattia solo se entrambi i genitori trasmettono la mutazione (trasmissione quindi recessiva), altre la causano anche se la mutazione riguarda solo una delle due copie del gene (trasmissione dominante).

Un altro esempio: sebbene la duplicazione o una mutazione puntiforme del gene della PMP22 siano normalmente responsabili di CMT 1A a trasmissione dominante, esistono casi di CMT 1A autosomica recessiva dovuti a doppia duplicazione o doppia mutazione o duplicazione più mutazione del gene della PMP 22.

Un altro sconvolgimento alla classificazione di Dyck, derivante dai progressi della diagnostica genetico-molecolare, è dato dalla non classificabilità della DSS, cioè della CMT 3, come entità geneticamente distinta. Già nel 1996 il Fazio-Loeb definiva la DSS come clinicamente sovrapponibile ad una forma particolarmente grave di CMT1 ed affermava che "la genetica rende pertanto discutibile un'individuazione nosografica della NESM tipo 3 (CMT 3) rispetto alla NESM tipo 1".

Attualmente la sindrome di *Dejerine-Sottas* (DSS) può essere dovuta a mutazione di ben 5 geni:

- a) **mutazioni puntiformi**, a trasmissione dominante, del gene PMP-22, lo stesso responsabile della CMT 1A, di cui pertanto rappresenterebbe solo una sindrome più grave e ad esordio più precoce;
- b) **mutazioni di P0**, sia a trasmissione dominante sia recessiva;



- c) **mutazioni del gene della periaxina**, responsabile della CMT 4F, a trasmissione recessiva;
- d) **mutazioni del gene EGR 2**, responsabile di CMT 1 da EGR 2, a trasmissione dominante;
- e) **mutazioni di un gene** ancora non identificato, situato nel locus 8q23-q24.

A seguito del collocamento delle forme recessive nel gruppo delle CMT 4, la CMT 1 è ora composta dalle forme demielinizzanti dovute a duplicazione o mutazione puntiforme del gene PMP22 (CMT 1A), alla maggioranza delle mutazioni del gene P0 (CMT 1B), ad alterazione di un gene ancora non identificato sito nel locus 16p13.1-p12.3 (CMT 1C) e ad alterazione del gene dell'EGR2 (CMT 1D).

La neuropatia ereditaria con suscettibilità alle paralisi da pressione (Hereditary Neuropathy with Susceptibility of Pressure Paralysis, **HNPP**) è dovuta o a delezione del gene PMP22 o a mutazione puntiforme (se ne conoscono 8) del medesimo gene che determina la produzione di una proteina priva di funzione: quindi il risultato è lo stesso, cioè meno PMP22 del normale.

La **CMTX**, di cui si conoscono un gene (connessina 32) e due *loci*, è generalmente classificata a parte nell'ambito delle CMT 1, pur potendosi riscontrare VCM superiori ai 38 m/sec.

La **CMT 2**, in base alla *Washington University*, ora contiene sia forme dominanti (più frequenti), sia forme recessive recentemente individuate in singole famiglie (una in Marocco, una in Costa Rica, una in Turchia, una in Tunisia) ad elevato tasso di consanguineità. [18]

### 3.2 - FORME CONSIMILARI DELLA GBS

Lo spettro clinico della GBS è molto eterogeneo e comprende diverse forme con similari. Di seguito, un elenco delle principali forme codificate.

➤ **AMSAN:** (da *Acute Motor-Sensory Axonal Neuropathy*), neuropatia sensoriale assonale motoria acuta.

E' caratterizzata dal danno dei nervi periferici sensitivi. La AMSAN si configura come una neuropatia soggettiva in quanto colpisce in modo diverso i vari soggetti almeno sull'entità dei sintomi e sul progredire della malattia, tenendo presente che la causa di tale degenerazione dei nervi può essere ricondotta di volta in volta a carenza di vitamine e/o a cause non definite, forse idiopatiche.

Per quanto riguarda la sintomatologia clinica, chi è affetto da questa patologia non può sentire, ad esempio, sensazioni di caldo o freddo in modo adeguato e in tempo reale, ma con qualche ritardo, lo stesso vale per il dolore.

I sintomi ricorrenti della patologia sono accentuati agli arti, soprattutto inferiori, e sono: dolore diffuso, stanchezza, formicolii, bruciore, scosse elettriche, disestesia/anestesia, difficoltà di deambulazione, equilibrio e percezione dello spazio, nonché problemi sulla motilità intestinale e vescicale. [5]

➤ **AMAN:** (da *Acute Motor Axonal Neuropathy*), neuropatia motoria assonale acuta.

E' una neuropatia motoria pura, con degenerazione assonale, paralisi di un motoneurone senza perdita della sensibilità. L'antecedente infettivo più frequente è l'infezione da *Campylobacter jejuni*: infatti il 40-50% dei pazienti hanno anticorpi

IgG anti-GM1 e il 24-60% IgG anti-GD1a. (v. oltre, pagg. 98) La malattia è frequente in Cina (McKhann, 1993) con epidemie estive in età infantile e giovanile nel 65% dei casi ed anche in Giappone, mentre è più rara in Europa (3-7% dei casi) ed è associata ad anticorpi anti-ganglioside. Dal punto di vista clinico, AMAN ha distribuzione prevalentemente distale. La sintomatologia clinica riguarda: l'interessamento di tutti i livelli dei nervi, dalla radice ai terminali e più marcato nelle radici ventrali, nervi spinali prossimali e nervi cranici inferiori; infiltrati di mononucleati perivascolari endoneurali (macrofagi, monociti, linfociti T); demielinizzazione multifocale e danno assonale. Non sono da tralasciare gli aspetti secondari all'inflammazione motoria, ossia la tossicità *bystander* (sorta di apoptosi indotta dalla trasmissione di materiale genetico da una cellula infetta ad una sana); degenerazione primaria similwalleriana della AMSAN, ossia una neuropatia traumatica che comporta una degenerazione dell'assone con secondaria distruzione della mielina a valle della lesione traumatica, mentre a monte si verifica la cosiddetta degenerazione retrograda con eventuale cromatolisi; aumentata espressione MHC-II nelle cellule di Schwann. E' possibile trovare anche altre alterazioni di laboratorio, ad esempio, lieve incremento degli enzimi epatici, iponatremia (concentrazione di sodio nel plasma del soggetto <135 mmoli/litro); rara glomerulonefrite da immunocomplessi con possibile ematuria e proteinuria. Entro la 10° settimana questo tipo di poliradiculopatia infiammatoria demielinizzante subacuta può avere una progressione cronica, trasformandosi in poliradiculopatia infiammatoria demielinizzante cronica (CIDP, v. oltre, pag. 75), causando insufficienza cardiaca nel 10-20% dei casi o morte per sepsi, embolia polmonare e arresto cardiaco; mentre il

recupero completo da CIDP entro 12 mesi è del 70%, entro 24 mesi del 82%; CIDP è recidivante per il 3% dei casi.

La terapia di questi casi di neuropatia demielinizzante è favorevole e data dal fatto che il blocco di conduzione motorio migliora e scompare in poche settimane, proprio in parallelo con l'andamento clinico a seguito della terapia con plasmaferesi o immunoglobuline ad alte dosi. Studi seriali della conduzione nervosa, inoltre, hanno evidenziato che il blocco si riduce e scompare senza che si sviluppi eccessiva dispersione temporale (ossia che la rimielinizzazione avviene in breve tempo dopo la demielinizzazione). [6]

➤ **MFS:** (da *Miller-Fisher Syndrome*), sindrome di Miller Fisher.

E' una neuropatia autoimmune ad andamento subacuto e conseguente, in molti casi, ad infezione da *Campylobacter jejuni* oppure *Hemophilus influenzae* nel 7% dei pazienti; riconosce anche precedenti diabete mellito, amiloidosi primaria e familiare, vasculite, infezione da HIV, tossicità da farmaci o tossine o forme ereditarie.

I ricercatori hanno scoperto che la malattia nella fase acuta è associata alla presenza di anticorpi con blocco neuromuscolare, alcuni dei quali (IgG ) possono essere diretti al ganglioside GQ1b. Il decorso più comune della malattia implica una pandisautonomia acuta, con insufficienza combinata simpatica e parasimpatica, in assenza di coinvolgimento sensitivo-motorio somatico. Per quanto riguarda il quadro clinico, si è notato che un gran numero di casi della malattia è stata riscontrata più frequentemente in Giappone con un'insorgenza media maggiore tra i 40 ed i 78 anni, a frequenza stagionale: si contrae di più in primavera (da marzo a maggio) e compare in principio con dolore ai piedi. La sintomatologia della sindrome si manifesta con

- atassia (100% dei casi);
- areflessia (100% dei casi): dalla prima settimana della malattia;
- asimmetrica (80% dei casi);
- debolezza orofaringea (26% dei casi) a livello del nervo cranico;
- forma frusta: paresi multiple dei nervi cranici (parestesia facciale bilaterale 24%);
- debolezza (20% dei casi);
- perdita sensoriale: minima (20% dei casi);
- oftalmoplegia completa o esterna (simmetrica o asimmetrica), con o senza ptosi (100% dei casi);
- ptosi (58% dei casi);
- midriasi (42% dei casi);
- distonia vescicale (16% dei casi);
- secchezza della bocca e costipazione, peraltro riferibili anche ad un fenomeno iatrogeno; mialgia; disimmetria atassica; diplopia; vertigini.

La debolezza delle estremità e dei muscoli del tronco è minima (mentre è massima nella sindrome di Guillain-Barrè); il dolore e l'intorpidimento (formicolio) dei piedi e delle gambe, invece, peggiora di notte con una sensazione di bruciore, che fa risvegliare, coinvolgendo le ginocchia fino alle anche, oltre ad una regressa sensibilità della zona perineale. [7]

➤ **CIDP:** (da *Polyneuropathy Chronic Inflammatory Demyelinating*),  
poliradicolopatia infiammatoria demielinizzante cronica.

E' una malattia rara dei nervi periferici caratterizzata da una graduale e crescente debolezza delle gambe e, in misura minore, delle braccia. È causata dal

danneggiamento della guaina dei nervi, detta mielina. La malattia si può verificare a qualsiasi età, sia nei maschi che nelle femmine. La debolezza si sviluppa nel corso di due o più mesi. In sostanza è la forma cronica della GBS. Le caratteristiche che aiutano a diagnosticare la CIDP sono descritte qui di seguito.

La presentazione tipica dei pazienti affetti da CIDP è caratterizzata dalla difficoltà di deambulazione che peggiora progressivamente nel corso di qualche mese. Inoltre, se la mielina dei nervi sensoriali è danneggiata, il paziente può avvertire formicolii o altre sensazioni anormali. All'esame obiettivo si osserva solitamente la perdita dei riflessi, come ad esempio quello del ginocchio o della caviglia. La valutazione da parte di un neurologo comprende spesso un esame elettrico, cioè uno studio elettromiografico della velocità di conduzione dei nervi, il che dimostra il rallentamento della velocità di conduzione dei segnali elettrici, o anche il blocco della conduzione. La puntura lombare, eseguita per analizzare il fluido cerebro-spinale, mostra valori tipicamente elevati di proteine con cellule normali, il che aiuta a confermare la diagnosi. I pazienti con varianti della CIDP, come ad esempio la neuropatia motoria multifocale, potrebbero presentare solo il rallentamento della conduzione in alcuni nervi motori dei muscoli. Il medico potrebbe effettuare analisi del sangue e delle urine, compresa l'analisi delle proteine, per trovare le cause della CIDP.

Sono disponibili varie possibilità di trattamento. È possibile utilizzare il prednisone, che è simile ai corticosteroidi protettivi ed antinfiammatori normalmente prodotti dal corpo, quale trattamento iniziale per diversi motivi: spesso aumenta la forza del paziente, la somministrazione per via orale risulta pratica, ed inoltre è economico. Gli effetti collaterali, tuttavia, possono limitarne l'uso. Altri due approcci terapeutici

si sono spesso dimostrati utili. È possibile effettuare facilmente la somministrazione endovenosa di dosi elevate di globuline immuni (IntraVenous ImmunoGlobulin, IVIg), cioè proteine protettive del sangue ottenute da volontari sani. Un altro trattamento, denominato scambio del plasma o plasmateresi (PE), comporta la rimozione di una parte del sangue del paziente e la reintroduzione delle cellule del suo sangue senza il plasma. Questo trattamento può essere efficace perché rimuove gli anticorpi nocivi presenti nel plasma. Se un paziente presenta miglioramenti in seguito ad una cura iniziale ma poi manifesta debolezza di nuovo, sarà possibile o ripetere la terapia iniziale o provarne un'altra. [16]

➤ **MMN:** (da *Multifocal Motor Neuropathy*), neuropatia motoria multifocale (con blocchi di conduzione).

È una neuropatia caratterizzata clinicamente da ipostenia ed ipotrofia muscolare lentamente progressiva, con crampi e fascicolazioni, senza deficit sensitivi. L'interessamento, a distribuzione multineuropatica, coinvolge prevalentemente gli arti superiori ed i distretti distali in modo asimmetrico. Dal punto di vista neuropatologico la MMN è ritenuta una variante motoria della sindrome di Guillain-Barré (GBS): si ipotizza che in questo tipo di neuropatia il danno assonale primitivo sia mediato da anticorpi, sistema del complemento e macrofagi a livello di nodi di Ranvier nell'assolemma e che quindi il blocco della conduzione nervosa non sia imputabile a demielinizzazione ma a blocco funzionale immunomediato (e reversibile) dei canali ionici presenti nel nodo di Ranvier. I ricercatori ipotizzano che AMAN e MMN rappresentino due stadi di gravità dello stesso processo immunomediato, in cui anticorpi anti-GM1 si legano al nodo di Ranvier inducendo, a

seconda dell'intensità della reazione immunitaria locale, un blocco funzionale e reversibile della conduzione nervosa od una degenerazione assonale. L'incidenza della MMN non è nota, anche se è stimata essere intorno a 1–2/100.000 persone.

La patogenesi della NMM non è del tutto nota, anche se la frequente risposta dei pazienti alla ciclofosfamide, alle immunoglobuline ad alte dosi (dato questo confermato in quattro studi randomizzati, in doppio cieco, controllati verso placebo su un totale di 46 pazienti) e la frequente associazione di tale malattia con anticorpi anti-gangliosidi, fanno ipotizzare che abbia eziologia immunomediata. Per quanto concerne la sintomatologia, le caratteristiche cliniche si caratterizzano per la presenza di:

- deficit motorio asimmetrico, prevalentemente distale agli arti superiori;
- frequente ipotrofia muscolare;
- iporeflessia incostante;
- decorso progressivo, più raramente a scalini.

A livello diagnostico, la caratteristica elettrodiagnostica della NMM è rappresentata dai blocchi focali di conduzione motoria, rilevabili in sede atipica e persistenti per anni. In una minoranza di pazienti, quest'alterazione può non esservi. Possono coesistere rallentamenti della velocità di conduzione motoria e segni di degenerazione assonale. La presenza di alti titoli sierici di anticorpi contro il ganglioside GM1 è molto frequente (circa nel 50% dei pazienti), mentre in altri si riscontrano anticorpi anti-GD1a.

I dati elettrofisiologici evidenziano:

- blocchi di conduzione motoria;
- VDC sensitiva normale;



- presenza di danno neurogeno, con segni di denervazione in atto.

I dati di laboratorio evidenziano la presenza di Ab sierici IgM anti-GM1 (20-80%).

In caso di diagnosi differenziale (DD), gli anticorpi anti-gangliosidi nella MMN, che sono stati descritti per la prima volta nel 1988 da Pestronk e altri ricercatori, sono stati successivamente confermati ampiamente in letteratura in una percentuale variabile di pazienti con MMN compresa tra il 30% e l'80%. Differenze nelle procedure ELISA usate nei diversi laboratori hanno messo in evidenza che gli anticorpi sono prevalentemente di tipo IgM e sono diretti principalmente contro il GM1 e meno frequentemente contro l'asialoGM1, il GD1a e il GM2. Sebbene tali anticorpi siano stati riscontrati occasionalmente anche in pazienti con altre patologie, tra cui la malattia del motoneurone (MND), numerosi studi tra cui una metanalisi, confermano che il loro riscontro è utile nella diagnosi differenziale tra malattia del motoneurone e MMN, anche se la loro negatività non permette di escluderne la diagnosi. Meno chiaro è il ruolo patogenetico di tali anticorpi nella MMN. Il riscontro di elevati titoli di anticorpi IgM anti-GM1 nel siero di pazienti affetti da MMN e la riduzione del titolo anticorpale nei pazienti migliorati in seguito a trattamento con ciclofosfamide aveva fatto ipotizzare che GM1 potesse essere il bersaglio della risposta immunitaria. Alti titoli di anticorpi anti-GM1 sono stati riscontrati anche in pazienti con altre patologie quali MND, neuropatie sensitivo motorie, CIDP e GBS, anche se gli studi finora effettuati non hanno permesso di individuare differenze nella fine specificità antigenica tra gli anticorpi anti-GM1 riscontrati nelle diverse sindromi motorie.

Il trattamento terapeutico è efficace. È stato riscontrato che numerosi pazienti non presentano una reattività anticorpale anti-GM1, ma hanno comunque una buona

risposta al trattamento immunologico. L'efficacia delle immunoglobuline per via intravenosa (IVIg) nel migliorare il quadro clinico della NMM è stata infatti dimostrata da diverse prove. E' da notare che il miglioramento clinico non si accompagna solitamente alla scomparsa dei blocchi di conduzione, né ad una riduzione dei titoli anticorpali. Tuttavia, sono proprio i pazienti che presentano entrambe queste alterazioni a mostrare la migliore risposta al trattamento. Una simile efficacia clinica a breve termine, però, non impedisce che si verifichi un lento deterioramento a lungo termine. In alternativa alle IVIg, l'unico trattamento immunosoppressivo che si è mostrato efficace è quello con ciclofosfamide (0,5-1 g/m<sup>2</sup> ogni 4-6 settimane), mentre non sono stati ottenuti successi con i glucocorticoidi o la plasmferesi. [5]; [6]

➤ **MDS:** (da *Schilder Disease*), malattia di Schilder o sclerosi diffusa.

E' una malattia demielizzante estremamente rara del SNC ad esordio in età pediatrica, con decorso subacuto-cronico, che presenta solitamente un generalizzato interessamento encefalico. Vi sono casi di MDS intracranici ricorrenti che coinvolgono il midollo spinale cervicale.

L'inserimento della sclerosi mielinoclastica diffusa di Schilder tra le malattie demielinizzanti che entrano in diagnosi differenziale con la SM è alquanto controverso, essendo ritenuta una "variante" della stessa SM. Solide evidenze in letteratura tuttavia ne sottolineano l'esistenza come malattia con una entità clinica autonoma.

Infatti, in alcuni casi, tipiche lesioni demielinizzanti del SNC sono attribuibili ad alterazioni dell'osmolarità plasmatica che si verificano nell'ambito di diverse

malattie sistemiche (mielinolisi pontina ed extrapontina). Le alterazioni del volume e della composizione dei liquidi sono manifestazioni frequenti in numerose malattie. Il bilancio corporeo dei liquidi, variabile dalla grave iperidratazione alla disidratazione, è strettamente correlato al contenuto elettrolitico corporeo, alla distribuzione dei fluidi fra i compartimenti, all'osmolarità intra ed extracellulare, alla funzione metabolica cellulare.

La sintomatologia sistemica può mimare un tumore intracranico o un ascesso.

Le manifestazioni neurologiche possono essere sovrapponibili a quelle della SM, sebbene prevalgono particolari quadri clinici, quali:

- emiplegia;
- deterioramento comportamentale;
- cambiamenti di personalità cefalea;
- letargia.

Per quanto riguarda il trattamento diagnostico e terapeutico, il quadro neuroradiologico è altrettanto peculiare e molte volte dirimente per la diagnosi: alla risonanza magnetica dell'encefalo, nel cervelletto e nel tronco-encefalo si osservano tipiche aree estese e confluenti di demielinizzazione diffusa, con quadri di perdita assonale spesso associata a cavitazioni. Tali lesioni si riducono rapidamente di dimensione a seguito della terapia con steroidi. Le immagini relative alle lesioni iperintense in T2 possono persistere per periodi di tempo più lunghi.

La somministrazione di steroidi risolve il quadro acuto, sebbene le sequele neurologiche spesso persistano; il decorso clinico è spesso caratterizzato da nuove ricadute.

Le attuali conoscenze patogenetiche della malattia sono principalmente basate su modelli sperimentali animali e su studi anatomo-patologici nell'uomo. Non è descritta pertanto in letteratura la prognosi a lungo termine della malattia. [8]

➤ **LEMS:** (da *Lambert Eaton Myasthenic Syndrome*) sindrome miasteniforme di Lambert Eaton.

E' una rara patologia paraneoplastica, una canalopatia autoimmune, ossia una malattia neuromuscolare con ipostenia prevalentemente prossimale. Questa malattia autoimmunitaria è caratterizzata da debolezza ed affaticabilità dei muscoli prossimali, in particolare del cingolo pelvico, delle estremità degli arti inferiori, del tronco e del cingolo scapolare. La causa è da ricercarsi in una ridotta liberazione di acetilcolina a livello della placca neuromuscolare, dovuta all'effetto di autoanticorpi diretti contro i canali del calcio ( $Ca^{2+}$ ) presinaptici. La disfunzione del canale presinaptico del calcio, infatti, porta ad una riduzione della quantità di acetilcolina rilasciata in risposta allo stimolo del nervo. La debolezza muscolare, dunque, è causata da un'alterazione della trasmissione dell'impulso a livello della giunzione neuromuscolare.

La patogenesi della sindrome di Eaton-Lambert consiste nella distruzione dei canali del  $Ca^{++}$  voltaggio-dipendenti, dovuta ad un processo autoimmunitario. Recenti risultati suggeriscono che i principali fattori patogenici sono gli anticorpi contro i canali del  $Ca^{++}$  tipo P/Q, in quanto i suddetti canali costituiscono una componente essenziale nel meccanismo di rilascio del neurotrasmettitore. La sinaptotagmina, una delle proteine sinaptiche associate funzionalmente al canale del  $Ca^{++}$  voltaggio-dipendente, è risultata essere immunogena nella patogenesi della malattia.

I fluorochinolonici sono stati associati con disturbi sensitivi periferici e con debolezza, soprattutto in pazienti con miastenia grave o sindrome miastenica di Lambert-Eaton.

Generalmente, l'esordio della malattia è subacuto e il decorso è progressivo in modo variabile. Il 60% dei pazienti affetti da LEMS presentano associazione con tumori, nella maggior parte dei casi con il carcinoma a piccole cellule del polmone. Nel 40% dei pazienti senza carcinoma, invece, rimane sconosciuto lo stimolo alla produzione degli anticorpi contro il canale del  $Ca^{++}$  voltaggio-dipendente; tali pazienti comunque presentano diversi autoanticorpi specifici verso altri organi. [9]

Sul piano clinico, gli arti inferiori sono interessati più frequentemente dei superiori e ciò determina una deambulazione lenta e ondeggiante. I nervi cranici sono più raramente interessati. Sono meno coinvolti i muscoli bulbari ed extraoculari. Le principali manifestazioni cliniche consistono in:

- debolezza dei muscoli prossimali, delle estremità degli arti inferiori (diminuzione dei riflessi tendinei profondi) e disfunzione autonoma;
- insufficienza respiratoria;
- secchezza della bocca;
- alterazione dei riflessi pupillari;
- impotenza;
- ipoidrosi;
- ipotensione ortostatica.

La diagnosi può essere confermata dalle caratteristiche cliniche e dalla stimolazione ripetitiva del nervo. Il titolo anticorpale degli autoanticorpi contro i canali del calcio voltaggio dipendenti e i test elettrofisiologici (elettromiografia - EMG - standard,

EMG qualitativa, stimolazione muscolare diretta, EMG quantitativa, ecc.), aiutano a differenziare la sindrome miastenica di Lambert-Eaton da altre disfunzioni della giunzione neuromuscolare. L'elettromiografia con stimolazione di una singola fibra può essere usata per monitorare la terapia dei pazienti affetti dalla sindrome. Gli anticorpi sono ricercati tramite immunoprecipitazione del canale ionico, marcato con neurotossine radioattive.

La diagnosi della LEMS è quindi confermata dal significativo aumento dell'ampiezza del potenziale d'azione muscolare composto, registrato in superficie dopo contrazione isometrica e dal significativo aumento dopo stimolazione nervosa ripetitiva ad alta frequenza. Metodi basati sull'immunoprecipitazione delle subunità  $\beta$  possono essere impiegate come test aggiuntivo di grande aiuto nella diagnosi della sindrome di LEMS. La tecnica che impiega la  $^{125}\text{I}$ -omega-conotossina MVIIC per la ricerca degli anticorpi contro il canale del  $\text{Ca}^{++}$  voltaggio-dipendente tipo P/Q è altamente specifica per la sindrome miastenica di Lambert-Eaton e, impiegando anticorpi leganti sensibili, potrebbe essere di maggior valore nella diagnosi della malattia rispetto alla tecnica che impiega anticorpi bloccanti. È stato riscontrato che in alcuni pazienti con sindrome di Lambert-Eaton, vi è un'aumentata incidenza degli aplotipi HLA-B8 e-DR3 come avviene in altre patologie autoimmunitarie.

La terapia, una volta avvenuta la diagnosi clinico-strumentale, è molto importante: il paziente con neuropatia periferica deve entrare, il più rapidamente possibile, nel percorso riabilitativo che si avvarrà del supporto farmacologico più appropriato, ivi compresa la modulazione del sistema immunitario. Recenti studi hanno evidenziato che pazienti affetti da LEMS migliorano in modo transitorio dopo somministrazione di alte dosi di immunoglobuline (IVIg) per via endovenosa. Le immunoglobuline

ottengono un miglioramento temporaneo della forza muscolare dovuta probabilmente all'indotta riduzione degli anticorpi contro il canale del  $\text{Ca}^{++}$ .

La riduzione però non è dovuta ad un'azione di neutralizzazione diretta delle immunoglobuline, anche se non può essere esclusa una azione anti-idiotipica. Come in altre malattie causate da auto-anticorpi, il miglioramento dopo la somministrazione d'immunoglobuline potrebbe essere allo stesso modo associato alla diminuzione degli auto-anticorpi patogeni. [9]

La ciclosporina-A è stata usata in un paziente con la sindrome di LEMS, ottenendo una completa remissione clinica e neurofisiologica dopo 4 mesi di terapia. La guanidina idrocloride si è rivelata essere più efficace nell'aumentare la forza rispetto alla neostigmina o alla piridostigmina. Successivamente è stata ampiamente sostituita dalla 3,4-diaminopiridina associata alla piridostigmina. A causa degli effetti collaterali non prevedibili della diaminopiridina (attacchi convulsivi, stato confusionale, parestesie), alcuni clinici preferiscono somministrare a giorni alterni prednisone e azatioprina supplementata da immunoglobuline per via endovenosa. Attualmente sono disponibili diversi farmaci ed interventi terapeutici in grado di produrre un significativo miglioramento clinico. I pazienti dovrebbero sottoporsi ad accertamenti per individuare patologie tumorali sottostanti, trattando le quali si ottiene una remissione o un miglioramento dei sintomi.

I diversi trattamenti proposti in letteratura per la sindrome paraneoplastica di Lambert-Eaton si focalizzano sul trattamento del tumore primitivo. Il trattamento sintomatico della disfunzione giunzionale, invece, si basa sull'impiego di farmaci colinergici, immunosoppressori ed immunomodulatori, utili qualora la terapia antineoplastica non abbia avuto successo. Si considera che la sola plasmateresi non

sia sufficiente a produrre un efficace miglioramento, a causa dell'alta produzione di anticorpi contro il canale del  $\text{Ca}^{++}$  voltaggio-dipendente tipo P/Q. La diaminopiridina risulta essere un trattamento efficace e sicuro nella sindrome; infatti, la 3,4-diaminopiridina è ben tollerata nei trattamenti a breve e lungo termine, con modici effetti collaterali. Tale sostanza è un farmaco orfano (v. cap.4, pagg. 136-138), approvato per uso clinico in molti Paesi europei, che però necessita di sostegno poiché il suo solo utilizzo non si è rivelato redditizio. [9]

***Altre forme/classificazioni meno frequenti della GBS.***

- **PDN** (*Polyproteinaemic Demyelinating Neuropathy*), o neuropatia demielinizzante poliproteinemica;
- **SIDP** (*Subacute Inflammatory Demyelinating Neuropathy*) o neuropatia sub-acuta infiammatoria demielinizzante;
- **Neuropatia Acuta motoria**, coinvolge prevalentemente la funzione responsabile della motilità, forza prensile, estensoria e flessoria, antigravitazionale, ecc.;
- **Neuropatia Acuta Sensitiva**, coinvolge prevalentemente la funzione neuronale responsabile dalle sensibilità;
- **Neuropatia Acuta Autonoma**, coinvolge la funzione neuronale autonoma, responsabile del funzionamento della muscolatura involontaria;
- **Neuropatia Cronica Assonale**, rarissima,
- **Neuropatia Acuta Brachiale**, possibile paraplegia degli arti superiori;



- **Neuropatia Acuta Lombosacrale**, con possibile paraplegia degli arti inferiori. [19]

### 3.3 - SINTOMATOLOGIA

La sindrome di GBS ha un esordio acuto. L'acme si raggiunge in 1-2 ore o giorni, massimo in 1-2 settimane e si manifesta con tetraplegia e insufficienza respiratoria. La GBS è una malattia monobasica: circa il 7-16% dei pazienti soffre di episodi ricorrenti di peggioramento dopo un iniziale miglioramento.

In un soggetto affetto dalla sindrome di Guillain-Barrè si osservano i seguenti disturbi:

- disturbi sensitivi, come la comparsa di parestesie o ipoestesia (lieve, in genere ipopallestesia distale) con dolore nell' 85% dei casi, soprattutto a livello interscapolare o lombare irradiato agli arti inferiori, bruciori alle dita di mani e piedi e, seppur meno frequenti, mialgie con rigidità articolare;
- ipostenia simmetrica progressiva, prima distale poi prossimale, paralisi ascendente di Landry, che partendo dagli arti inferiori si diffonde nell'arco di ore o giorni fino agli arti superiori, ai muscoli facciali e orofaringei, e nei casi più gravi ai muscoli respiratori, provocando dolori muscolari, *deficit* della sensibilità discriminativa profonda (pressione e vibrazione); ma in circa 1/3 dei casi tutti gli arti possono essere coinvolti contemporaneamente e nel 10% dei casi gli arti superiori possono essere colpiti per primi. [16, 17, 10]

I sintomi meno frequenti invece sono i seguenti:

- esordio della sindrome attraverso l'interessamento dei nervi cranici nel 45-75% degli affetti, con conseguente paresi facciale nel 50% dei casi bilaterale e coinvolgimento dei muscoli extraoculari IX-XII, determinando sindrome bulbare;
- interessamento esclusivo facio-faringo-cervico-brachiale con risparmio degli arti inferiori;
- interessamento isolato degli arti inferiori (diagnosi differenziale (DD) con lesione caudale);
- disfunzione autonoma, nel 15% dei pazienti, che comprende:
  - ipotensione ortostatica, anidrosi;
  - ritenzione urinaria, atonia intestinale, iridoplegia;
  - ipertensione, tachiaritmia, diaforesi, vasocostrizione distale;
  - bradicardia, disturbi della conduzione, asistolia;
  - alterazioni dell'elettrocardiogramma (ECG);
- rara complicazione: *pseudotumor cerebri* con papilledema;
- debolezza dei muscoli respiratori, che può essere abbastanza grave da giustificare la ventilazione artificiale in circa il 25% dei pazienti;
- epidemie estive in età infantile e giovanile in Cina. [16, 10]

I riflessi osteotendinei sono alterati nella I settimana nel 30% dei casi e nella III nel 70% dei casi. La sindrome di Miller Fisher invece, è caratterizzata da oftalmoplegia acuta, atassia sensitiva, iporiflessia. Le anomalie oftalmologiche possono variare e includono: oftalmoplegia acuta e cronica, oftalmoplegia internucleare, sindrome di Parinaud, spasmi muscolari, paralisi divergente, neurite ottica, ptosi o retrazione della palpebra, paralisi del nervo isolato abducente e midriasi areflessica. Inoltre, i pazienti con la MFD possono accusare paralisi dei nervi facciali e bulbari. Nel 90%

dei pazienti c'è positività per gli anticorpi anti-GQ1b, gangliosidi presenti sulle fibre dei nervi oculomotori e sulle fibre sensitive di grosso calibro. Sebbene la sindrome di Fisher sia auto-limitante, ci sono stati pazienti con progressiva insufficienza respiratoria, richiedente ventilazione meccanica. Inoltre, sono state descritte altre gravi complicazioni, tra cui coma, cardiomiopatia autonoma e ballismo generalizzato.

Un dato molto rilevante, sul quale è opportuno porre particolare attenzione, è l'elevata percentuale di casi in cui la sindrome è preceduta da un'infezione delle vie aeree superiori o da una diarrea, provocata dal *Campylobacter jejuni*, riscontrata infatti nel 76% dei casi, o da altre infezioni virali da EBV (virus di Epstein-Barr, appartenente alla famiglia degli Herpes virus), CMV (Citomegalovirus), HIV (Human Immunodeficiency Virus). [17]

Certamente un ruolo a favore dell'insorgenza di queste neuropatie è giocato da episodi infettivi e da patologie pregresse (ad esempio, epatite o altre forme di episodi patologici cronici su base virale, interventi chirurgici recenti, *lupus*, infezione da Herpesvirus, artrite reumatoide, psoriasi). [16]

Anche se le forme assonali di GBS possono apparire simili all'AIDP (poliradicolopatia infiammatoria demielinizzante acuta), vi sono importanti differenze cliniche. In particolare, le forme assonali di GBS mostrano un percorso più rapido e grave, con frequente coinvolgimento delle vie respiratorie con necessità della ventilazione assistita, insieme al coinvolgimento dei nervi cranici, e poco frequente coinvolgimento del sistema nervoso autonomo. La forma AMAN (neuropatia motoria assonale acuta) è una sindrome pura motoria, a rapida insorgenza, di debolezza muscolare e assenza di riflessi, mentre la forma AMSAN

(neuropatia sensoriale assonale motoria acuta) è clinicamente caratterizzata dalla presenza di entrambi i deficit, sia motori che sensoriali.[10]

### **3.4 - EPIDEMIOLOGIA**

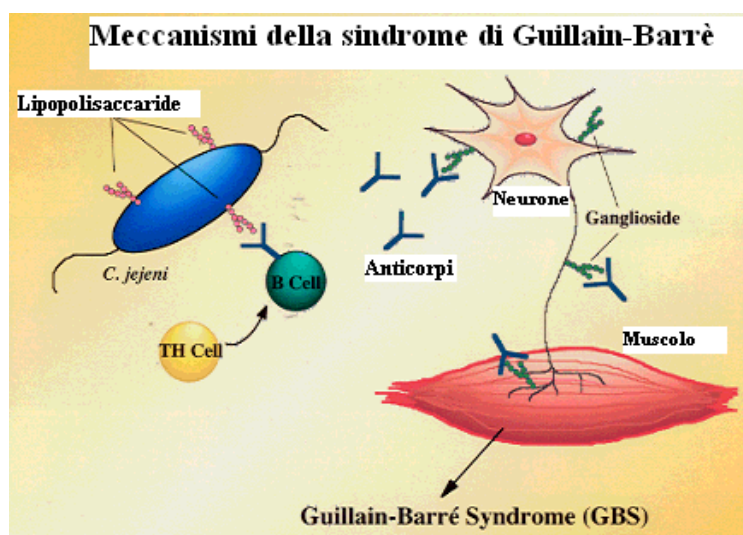
GBS è la causa più comune di paralisi acuta nei paesi occidentali con un'incidenza media di 1.8/100.000/anno in Europa [1], che scende a 0,6-4 casi/100.000 persone in tutto il mondo. Gli uomini rispetto alle donne hanno una probabilità 1,5 volte maggiore di essere colpiti e l'incidenza aumenta con l'età, da 1 caso/100.000 persone, nei soggetti di età inferiore a 30 anni, a circa 4 casi/100.000 persone in soggetti di età superiore ai 75 anni. In Cina, l'incidenza negli adulti è di 0,66 casi/100.000 persone. Le presentazioni atipiche, come la sindrome di Miller-Fisher (MFS), sono molto meno frequenti, con un'incidenza di 0,1 casi/100.000 persone. [10]

GBS è letale per il 5-10% dei colpiti (33% prima dell'introduzione della ventilazione assistita), è frequentemente associata, nelle 4 settimane prima dell'esordio dei sintomi, ad immunodepressione (linfoma di Hodgkin, farmaci immunosoppressori, trapianto di midollo osseo), farmaci (streptochinasi, gangliosidi, eroina), e punture d'insetto. [16] Circa 2/3 dei casi di GBS ha un'infezione antecedente delle vie respiratorie superiori o ha sofferto di gastroenterite, entro 6 settimane prima della comparsa dei sintomi. Gli agenti infettivi di solito associati alla sindrome di Guillain-Barrè includono virus di Epstein-Barr, *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter jejuni* e Citomegalovirus. In Cina, le epidemie della forma estiva di GBS, l'AMAN, sono risultate essere successive ad infezione da *Campylobacter jejuni*. Oltre alle

infezioni antecedenti, la GBS si sviluppa anche dopo alcune vaccinazioni. Preoccupazioni circa la GBS vaccino-indotta sono state sollevate in seguito alla vaccinazione contro l'influenza stagionale del 1976-77, quando si è osservato un rischio statisticamente significativo dell'aumento di GBS nelle 6-8 settimane successive la vaccinazione per l'influenza A suina in New Jersey. Inoltre, la GBS si è manifestata anche dopo la vaccinazione con il vaccino anti-epatite e il vaccino meningococcico coniugato (MCV4). La GBS è stata segnalata anche dopo interventi di chirurgia e dopo trauma cranico. I meccanismi che legano la GBS con la chirurgia o i traumi rimangono poco chiari. Tuttavia, sono state proposte alcune teorie: la chirurgia e i traumi possono modificare sia l'immunità cellulare che quella umorale. In particolare, i traumi cranici impartiti da lesioni o interventi chirurgici possono essere associati con la depressione dell'immunità cellulare e la produzione di anticorpi antimielina. Inoltre, lo stress maggiore da trauma cranico o da un intervento chirurgico può comportare l'attivazione di processi latenti che potrebbero a loro volta influenzare il sistema immunitario, com'è stato documentato in seguito a lesioni del midollo spinale. E' sorprendente, a questo proposito, che la GBS non sia stata associata a lesioni dei nervi periferici, che porterebbero ad ipotizzare la creazione di anticorpi contro il tessuto nervoso stesso in seguito all'esposizione del nervo periferico al sistema immunitario, stimolando in tal modo l'insorgenza della sindrome di Guillain-Barrè. [10]

### ***Fattori scatenanti la GBS.***

Molto significativo è un dato emerso dalla letteratura, che indicano che il 50% circa dei casi di sindrome di Guillain-Barrè si verifica in seguito ad infezione virale o batterica, e che di questi ultimi il 76% è composta da *Campylobacter jejuni*. Negli ultimi 10 anni i casi di campilobatteriosi sono molto aumentati e oggi sono più del doppio dei casi di salmonellosi. Le infezioni da *Campylobacter spp.* derivano principalmente dal consumo di latte crudo, acqua contaminata, carne rossa poco cotta e carne di pollame poco cotta, contatto diretto con animali domestici affetti o viaggi internazionali (v. cap. 2, pagg. 30-31). I sintomi di campilobatteriosi variano da diarrea ad altre malattie invasive includenti la GBS. Approssimativamente, 1 caso di GBS si verifica ogni 1000 casi di campilobatteriosi (1/1000): di questi pazienti, il 20% ha sequele di disabilità e alcune volte necessitano di ventilazione meccanica. Secondo uno studio danese [11], la GBS sembra essere il risultato di mimetismi molecolari da parte dei lipoligosaccaridi (LOS) di una parte della parete cellulare del

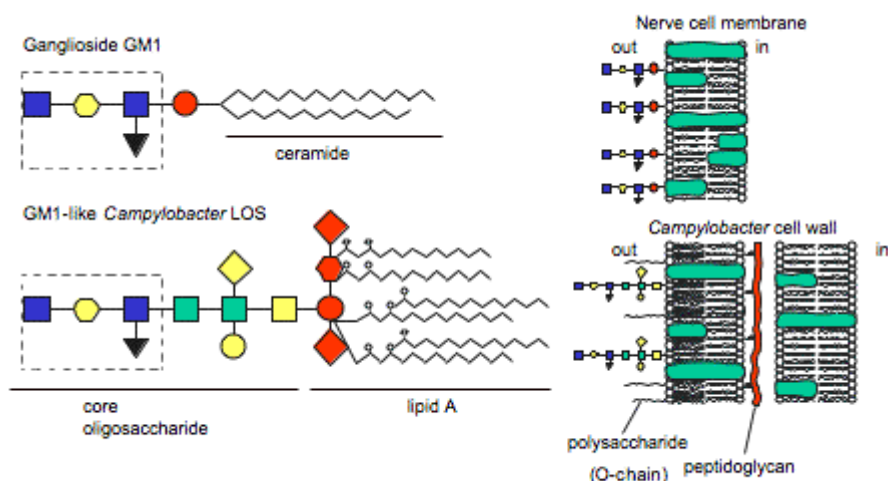


**Fig. n.6:** schema rappresentativo del processo di mimetismo molecolare. (da: [http://www.dsa.unipr.it/giavelliGBSguida\\_ainp.html](http://www.dsa.unipr.it/giavelliGBSguida_ainp.html))

*Campylobacter jejuni* verso i nervi gangliosidici (v. oltre, pag. 90). Gli anticorpi contro i gangliosidi mimici aumentano nel decorso della campilobatteriosi e possono provocare la demielinizzazione dei nervi e la degenerazione assonale. Lo studio ha utilizzato la tecnica di tipizzazione di sequenza su multi-loci (*Multy Locus Sequenze Typing*, MLST), che è stato uno strumento per discriminare i *Campylobacter spp.* isolati e definire una struttura di popolazione. MLST è basato su un profilo allelico ottenuto dall'analisi delle sequenze di 7 geni principali del *Campylobacter*; sono stati quindi determinati diversi sintomi clinici nei pazienti a seconda del tipo di gene. Ciò è servito per esaminare l'associazione tra diversi genotipi di *Campylobacter jejuni* e aspetti clinici differenti. I pazienti cui sono state diagnosticate altre gastroenteriti o artriti reattive hanno fornito le basi di uno studio effettuato in Danimarca. I dati ottenuti con MLST hanno identificato un numero di sequenze tipo (ST) che sono state strettamente associate a infezioni umane. Tra le ST esaminate, ST22 e ST45 sono quelle che determinano la GBS. Anche un altro studio di Dingle e colleghi [18], suggerisce la possibile relazione tra i complessi ST22 e gli isolati GBS. L'autore, inoltre, ha osservato che il complesso ST45 era stato sottorappresentato tra gli isolati GBS. Dato quindi che gli studi effettuati in Danimarca e nel resto del mondo esprimono dati simili, si conferma una possibile correlazione tra alcuni complessi tipo ST22 e lo sviluppo di GBS. [11]

A conferma dell'ipotesi che solo particolari sierotipi di *Campylobacter jejuni* siano collegati con l'insorgere della sindrome di Guillain-Barrè, c'è uno studio pubblicato nel 2001 [12] che ha analizzato una particolare popolazione genetica molecolare di *Campylobacter jejuni* che sembra essere associata a GBS. Infatti, sembra che sia una ben riconosciuta forma di gastroenterite da *Campylobacter* a determinare lo sviluppo

di GBS. I lipooligosaccaridi (LOS) delle specie appartenenti a *Campylobacter*, contengono una struttura principale esterna che è identica alle strutture oligosaccaridi terminali presenti sia nei complessi gangliosidici, come GM1 e GD1, sia nel tessuto periferale nervoso; proprio per questo motivo, la risposta immunitaria degli ospiti suscettibili al lipooligosaccaride reagisce con i recettori dei nervi periferici, causandovi demielinizzazione o degenerazioni assonali. In



**Fig. n.7:** schema della similitudine molecolare tra LSO e GM1, base del mimetismo anticorpale. (da: [www.biodavindson.edu](http://www.biodavindson.edu))

particolare, i sierotipi stabili al calore sono stati associati con GBS, inclusi i sierotipi HS:19 e HS:41. Inoltre, il rischio di sviluppare GBS dopo infezione con HS:19 è particolarmente maggiore se in seguito a precedente un infezione con altri sierotipi. Questi dati suggeriscono che le forme HS:19 possiedono caratteristiche uniche, che possono causare GBS dopo infezione da *Campylobacter*. Per capire, infine, se le forme HS:19 sono clonali e se certi sottotipi sono associati con GBS, si è usata l'elettroforesi enzimatica multi-loci (*Multi locus Enzyme Electrophoresis*, MLEE) e altri tipi di analisi simili, su di una serie di stipiti di *Campylobacter* isolati da pazienti



con GBS e gastroenteriti, confermando ulteriormente che il sierotipo HS:19 è associato allo sviluppo della sindrome di Guillain-Barrè. [12]

Molti casi si sono verificati in seguito a vaccinazioni di massa, come nelle persone che avevano ricevuto la vaccinazione contro l'influenza suina nel 1976. Le attuali teorie indicano un meccanismo autoimmunitario che induce gli anticorpi e i globuli bianchi del sistema immunitario del paziente a danneggiare la guaina mielinica dei nervi, provocando così la debolezza e le sensazioni anormali tipiche delle neuropatie ed in particolare della GBS. [20]

A proposito delle vaccinazioni, il vaccino antinfluenzale è quello più frequentemente incriminato. Ci sono diverse segnalazioni che confermano che una semplice vaccinazione può far scatenare tale sindrome. [21]

Una di queste segnalazioni riguarda la vaccinazione contro la poliomielite, che individuò la Sindrome di Guillain-Barrè come la causa più frequente di paralisi flaccida degli arti inferiori. L'incidenza annuale della GBS nei bambini in età inferiore ai 15 anni è risultata in Finlandia di 0,38 casi/100.000 bambini e di 0,91/100.000 in America Latina. [22]

Vi era un sospetto di comparsa di GBS anche dopo vaccinazione contro morbillo, parotite e rosolia, ma questo è stato smentito da un recente studio finlandese svolto da Patja A et al., che ha considerato il problema sulla base di uno studio retrospettivo. Dal 1982, infatti, due dosi di vaccino cosiddetto MPR, da Morbillo, Parotide, Rosolia, vennero somministrate a un elevato numero di bambini a 14-18 mesi e a 6 anni di età, con una copertura superiore al 95%. Vennero raccolti tutti i dati relativi ai pazienti ospedalizzati in Finlandia con diagnosi di GBS fra il 1982 e il 1986. Sui circa 630.000 bambini che ricevettero 900.000 dosi di vaccino, 20 dei 24

pazienti di età <12 anni erano stati vaccinati: dall'esame dei singoli casi è risultato che la vaccinazione MPR non aumenta l'incidenza di GBS e che non è stata notata alcuna variazione nella frequenza dei casi di GBS a qualsiasi distanza di tempo dalla vaccinazione MPR. Quindi, è stato concluso che non vi è alcuna associazione casuale fra vaccinazione MPR e GBS. [22]

Al contrario, invece, negli USA nel 2005 l'FDA (*Food and Drug Administration*) ed i CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), ricevettero la segnalazione di cinque casi di sindrome Guillain-Barrè in giovani appena vaccinati con Menactra<sup>®</sup>, un vaccino meningococcico coniugato A, C, Y e W135. L'infezione

#### ***National Vaccine Information Center (NVIC)***

Il Centro Nazionale Americano delle Informazioni sui Vaccini (NVIC) è un'organizzazione nazionale, senza scopo di lucro, fondata nel 1982. Fu la prima e la più grande organizzazione fondata nell'ambito della protezione del consumatore e dell'informazione sui vaccini di massa. NVIC è dedicato alla prevenzione di decessi e di danni da vaccino, attraverso istruzione pubblica: divulga informazioni indipendenti su malattie e vaccini, ma soprattutto non promuove, ne si schiera contro l'uso dei vaccini, bensì fornisce la disponibilità di tutte le informazioni utili a far compiere scelte consapevoli al consumatore. NVIC, inoltre, offre assistenza a pazienti che hanno sofferto di reazioni da vaccino; promuove la ricerca per valutare la sicurezza e l'efficacia dei vaccini, (ad esempio, identificare i fattori che mettono ad alto rischio di reazioni avverse i consumatori), e controlla lo sviluppo, la regolamentazione e la legislazione dei vaccini. L'organizzazione lavora per proteggere il diritto dei cittadini di essere informati sugli interventi medici che comportano un rischio di danno o di morte per loro o per i loro bambini, incluso il rischio da vaccinazione.

#### ***Storia dell'NVIC.***

NVIC fu fondato nel 1982 dai genitori di bambini che furono colpiti o morirono da reazioni da vaccino detto DPT, da Diftero, Pertosse, Tetano. Situato a Vienna (Virginia, USA), questa organizzazione senza scopo di lucro è sostenuta totalmente da donazioni pubbliche dei cittadini e non riceve concessioni sociali, federali o statali. Nel 1986 i cofondatori di NVIC lavorarono con il Congresso all'Atto Nazionale sul Danno da Vaccino nell'Infanzia. Questa legge storica diede credito alla sofferenza dal cosiddetto danno da vaccino dei pazienti e a quella delle famiglie coinvolte, nonché al bisogno di sicurezza nel sistema di vaccinazione di massa. NVIC lavora per elevare gli standard statali per la concessione di licenze dei vaccini. Nel 1996 ottenne dalla FDA, dopo 14 anni, l'autorizzazione ad un vaccino di anti-pertosse purificato (vaccino di DTaP) per bambini americani. Nel 1999 il vaccino vivo contro la poliomielite fu sostituito dal vaccino anti-poliomielite inattivato, uno sforzo che eliminò in America i casi di polio-paralitici. Cofondatori e membri di NVIC hanno rappresentato i consumatori nelle maggiori e più importanti commissioni a livello americano, come all'*Advisory Commission on Childhood Vaccines*, la *National Vaccine Advisory Committee*, l'*Institute of Medicine's Vaccine Safety Forum*, la *FDA Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee*, la *Vaccine Policy Analysis Collaborative* ed il *Consumers United for Evidence-Based Healthcare*. [25]

meningococcica che Menactra<sup>®</sup> previene è una delle principali cause di meningite

batterica che colpisce circa 1/100.000 persone/anno. Questa infezione può mettere a rischio la vita: il 10-14% dei casi ha esito fatale e l'11-19% dei sopravvissuti riporta grave disabilità. I 5 casi di GBS correlati alla vaccinazione si sono avuti in soggetti di 17-18 anni di età, con manifestazioni di debolezza o di anormale sensazioni alle braccia e alle gambe, 2-4 settimane dopo la vaccinazione. Tutti i soggetti colpiti hanno richiesto ricovero ospedaliero. [16]

Il Centro di Informazione Nazionale Americano sul Vaccino (*National Vaccine Information Centre*, NVIC) ha pubblicato un nuovo rapporto sulla sicurezza del vaccino anti-HPV (*Human Papilloma Virus*), in commercio come Gardasil<sup>®</sup>, analizzando i referti di fenomeni avversi forniti dal Sistema di Raccolta Dati sui Fenomeni Avversi da Vaccino (*Vaccine Adverts Events Reporting Sistem*, VAERS). [23] Il VAERS è un programma che raccoglie e divulga le informazioni riguardanti i fenomeni avversi dei vaccini una volta immessi nel mercato con l'approvazione dell'*U.S. Administration*, tutelando la salute del consumatore, nato dalla collaborazione tra il CDC ed l'FDA. [24] Secondo l'analisi eseguita dal VAERS, ci sono prove di un'associazione fra Gardasil<sup>®</sup> e la sSindrome di Guillain-Barrè, con un rischio significativamente aumentato di GBS e di altri rapporti avversi quando il Gardasil<sup>®</sup> è somministrato contemporaneamente ad altri vaccini, particolarmente con il vaccino anti-meningococco (Menactra<sup>®</sup>). Il NVIC sta invitando CDCs a pubblicare un rapporto consultivo e la relazione del 12 marzo 2005 per dichiarare che la somministrazione di Gardasil<sup>®</sup> è stata associata a 15 casi di GBS e che si osserva un rischio aumentato di GBS ed altri eventi avversi, descritti nel rapporto del VAERS, quando il vaccino è somministrato simultaneamente con Menactra<sup>®</sup> ed altri vaccini. Il dr. Vicky Debold, direttore di NVIC per la sicurezza del paziente, ha

dichiarato che le analisi dei rapporti su Gardasil<sup>®</sup> indicano che esiste una probabilità di circa 2-12 volte maggiore di sviluppo di GBS quando Gardasil<sup>®</sup> è stato somministrato congiuntamente a Menactra<sup>®</sup> piuttosto che da solo, sottolineando che questi risultati sono statisticamente significativi e non possono essere considerati come una semplice coincidenza. In particolare, i dati raccolti da VAERS indicano che il rischio di contrarre GBS aumenta dell'1% dopo la somministrazione di Gardasil<sup>®</sup> e Menactra<sup>®</sup> contemporaneamente. L'analisi comparativa eseguita da parte del NVIC sui rapporti di VAERS indica che, in particolare, si osserva un rischio aumentato in modo statisticamente significativo del verificarsi di:

- lesioni da cadute dopo svenimento (>674 %);
- convulsioni e problemi del sistema nervoso centrale (>301 %);
- problemi di coordinazione e neuromuscolari (>234 %);
- problemi cardiaci (>118 %);
- problemi respiratori (>114 %);
- casi di GBS (>1 %). [24]

### **3.5 - PATOLOGIA E PATOGENESI**

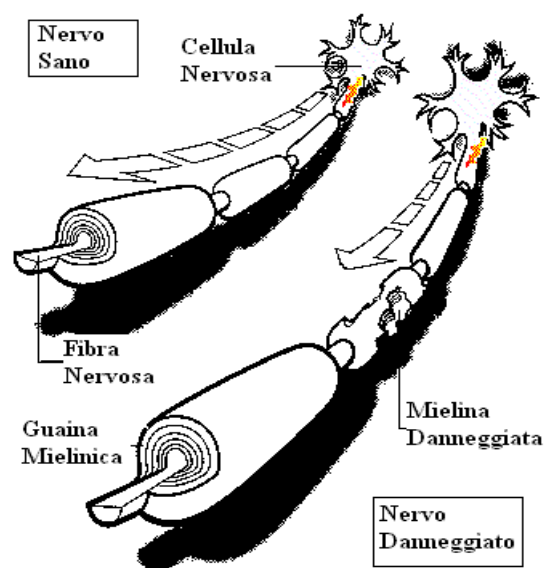
Nell'AIDP (poliradiculopatia infiammatoria demielinizzante acuta), sotto forma di GBS, c'è il possibile interessamento di tutti i livelli del sistema nervoso, dalla radice nervosa ai distretti terminali (più marcato a carico delle radici ventrali dei nervi spinali prossimali e dei nervi cranici inferiori); inoltre, studi patologici rivelano la presenza di infiltrati multifocali di cellule mononucleate (macrofagi, monociti, linfociti T) a livello perivascolare endoneurale e in tutto il sistema nervoso

periferico. La distribuzione dell'inflammation è spesso corrispondente al modello del *deficit* clinico; si osservano demielinizzazione multifocale, danno assonale secondario all'inflammation, tossicità *bystander* (ossia una sorte di apoptosi data del passaggio di materiale genetico da una cellula "infetta" ad una "sana") o degenerazione primaria similwalleriana (nella AMSAN) ed infine aumentata espressione MHC-II nelle cellule di Schwann. [7] Macrofagi attivati invadono le guaine mieliniche intatte, con conseguente danno della mielina e demielinizzazione. I meccanismi immunologici alla base dell'invasione macrofago-mediata dei nervi restano sconosciuti, anche se sono stati proposti due meccanismi potenzialmente complementari.

Secondo la prima ipotesi, i linfocita T *helper* attivati (CD4+) reagiscono contro antigeni specifici sulla superficie delle cellule di Schwann o contro la guaina mielinica, orientando così i macrofagi attivati in questa regione; mediatori chimici dell'inflammation rilasciati dai macrofagi attivati (ad es. matrice-metalloproteinasi) sono quindi alla base del danno alle cellule di Schwann e della successiva invasione del nervo periferico. Recentemente si è osservata una particolare alterazione della funzione delle cellule T in casi di GBS, ulteriore tesi a sostegno di un ruolo fondamentale delle cellule T nella patogenesi di questa sindrome.

Un'ipotesi alternativa propone l'importanza dell'immunità umorale nell'AIDP, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia: secondo questa tesi, gli anticorpi si legano agli epitopi sulla superficie esterna delle cellule di Schwann inducendo l'attivazione del sistema del complemento e la successiva distruzione della mielina, prima dell'invasione dei macrofagi. Nei casi più gravi di AIDP, i mediatori chimici e le cellule infiammatorie possono indurre danno assonale con un processo denominato

“degenerazione secondaria” o “degenerazione *bystander*”. In AMAN le caratteristiche patologiche differiscono da quelle in AIDP soprattutto a carico dei macrofagi, che invadono lo spazio tra le cellule di Schwann e gli assoni, lasciando intatta la guaina mielinica. Il processo di recupero in alcuni pazienti

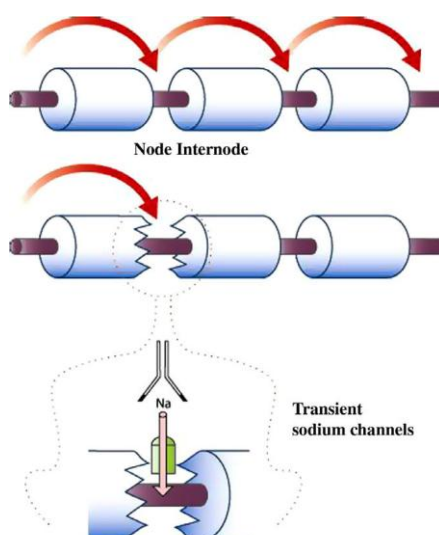


colpiti da AMAN, infatti, può essere rapido, dato che il processo patologico non comprende né blocchi di conduzione assonale né tantomeno degenerazione assonale distale. In casi molto gravi, gli assoni delle radici ventrali dei nervi possono essere danneggiati, con conseguente ripresa dilazionata. Molto importante è il ruolo dei canali del sodio ( $\text{Na}^+$ ).

Anche se la demielinizzazione e la perdita assonale possono rappresentare le lesioni croniche della GBS, il rapido miglioramento nelle caratteristiche cliniche in seguito a terapia con immunomodulatori, spesso per diverse ore al giorno, suggerisce che gli anticorpi diretti contro gli antigeni specifici dei nervi sono importanti nella patogenesi della GBS. Di particolare interesse, è la presenza nei pazienti di anticorpi diretti contro i gangliosidi, una famiglia di glicolipidi acidi la cui porzione lipidica si trova nella membrana delle cellule, mentre i residui di zucchero sono esposti sulla superficie extracellulare.

I gangliosidi sono abbondantemente presenti nel sistema nervoso e gli anticorpi specifici contro i gangliosidi sono stati individuati in diverse forme di GBS. Titoli elevati di anticorpi diretti contro il ganglioside GM1 (anticorpi anti-GM1) sono stati

segnalati nel 10-42% dei pazienti con la forma AMAN di GBS. Mentre il ruolo di anti-GM1 e altri anticorpi anti-gangliosidi nella patogenesi della GBS resta controversa, ci sono prove crescenti che gli stessi anticorpi anti-GM1 causano disfunzione reversibile dei canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendenti nei nodi di Ranvier, provocando insufficiente conduzione: i canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendenti dei situati nei nodi di Ranvier sono alla base della generazione di potenziali d'azione.



**Fig. n.8:** demielinizzazione ed interruzione della propagazione del potenziale d'azione tra i nodi di Ranvier per blocco del canale del sodio voltaggio-dipendente.

Questi canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendenti sono composti da 1 subunità  $\alpha$  transmembrana (a) associata a subunità  $\beta$  ausiliarie (b). Le subunità  $\alpha$  sono organizzate in quattro domini omologhi (I-IV), ciascuno dei quali contiene 6  $\alpha$  eliche transmembrana (S1-S6). Il segmento S4 è un sensore di tensione. Anche se la subunità  $\alpha$  (poro-formante) è sufficiente per l'espressione funzionale, la subunità  $\beta$  ne modifica la cinetica e la tensione di attivazione dei canali; inoltre, la subunità  $\beta$  è coinvolta nella localizzazione dei canali e interagisce con le molecole di adesione

cellulare, matrice extracellulare e citoscheletro intracellulare. In assoni mielinizzati, i canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendenti transitori (Nat) sono raggruppati nel nodo di Ranvier ad alta densità (circa  $1000/\text{m}^2$ ). Questa elevata densità di canali  $\text{Na}^+$  spiega la conduzione a salti per la presenza di un'elevata corrente tra nodo e nodo. Quando la membrana nodale è depolarizzata, la corrente  $\text{Na}^+$  interna è stabile. La conduzione del  $\text{Na}^+$  è voltaggio-sensibile e viene mantenuta con aumento della depolarizzazione. Questo, a sua volta, si traduce non solo in una maggiore depolarizzazione, bensì anche nella diffusione della depolarizzazione ai nodi vicini. Il processo della conduzione termina con l'inattivazione di questi i canali del  $\text{Na}^+$  voltaggio-dipendenti transitori (Nat). Si pensa che il blocco dei canali Nat, siano alla base del deficit clinico nella GBS, insieme alla demielinizzazione. In particolare, il rapido miglioramento del deficit clinico dopo terapia immuno-modulante, spesso entro poche ore, non può essere spiegata con la rimielinizzazione assonale, ma forse con la rimozione di anticorpi o di altri fattori circolanti che interferiscono con la funzione dei canali del  $\text{Na}^+$ . L'inattivazione dei canali del  $\text{Na}^+$  si traduce in un blocco di conduzione e del rallentamento della velocità di conduzione. Coerenti con questa nozione di blocco dei canali del  $\text{Na}^+$ , sono le scoperte che i gangliosidi GM1, obiettivi immunologici nella GBS, sono localizzati proprio nei nodi di Ranvier, dove i canali Nat sono raggruppati. Gli studi sugli animali hanno fornito prove che supportano un ruolo degli anti-GM1 nella patogenesi della GBS. Il trasferimento passivo di anticorpi anti-GM1 nel nervo sciatico di ratto, ha portato a un blocco di conduzione, insieme con la deposizione di immunoglobuline nel nodo di Ranvier e demielinizzazione degli assoni. Inoltre, sensibilizzazione di conigli bianchi giapponesi con una miscela di gangliosidi da cervello bovino contenente gangliosidi



GM1, ha indotto paralisi flaccida acuta e sviluppo di anticorpi IgG anti-GM1. Ulteriori anticorpi anti-GM1 causano il blocco dei canali del Na<sup>+</sup> voltaggio-dipendenti transitori nei nodi di Ranvier, così come disfunzione reversibile strutturale dei canali del Na<sup>+</sup> voltaggio-dipendenti. Più recentemente, studi di eccitabilità assonale in pazienti con GBS con nuove tecniche di monitoraggio, hanno riferito di un periodo refrattario con compromissione della trasmissione distale dell'impulso al polso nella forma AMAN di GBS. Dato che questo periodo refrattario riflette la funzione di trasmissione del canale Na<sup>+</sup>, è stato ipotizzato che il blocco dei canali di Na<sup>+</sup> da anticorpi anti-gangliosidi (anti-GM1 e anti-GalNAc-GD1a, evidente nel 90% dei pazienti testati con AMAN) sia responsabile della compromissione del periodo refrattario di trasmissione e, quindi, del fallimento nella conduzione. [10] Tuttavia, altri studi hanno dimostrato che gli anticorpi che agiscono sui gangliosidi GM1, determinano un blocco di conduzione o un blocco dei canali del Na<sup>+</sup>. Anticorpi diretti contro altri bersagli nervosi (eventualmente altri canali ionici), potrebbe essere in parte alla base della fisiopatologia di AIDP. Inoltre, altri fattori di circolazione, come l'interleuchina-2 (IL-2), che è elevata in GBS e induce il blocco dei canali del Na<sup>+</sup>, possono contribuire al deficit clinico. Sebbene la sindrome di Miller-Fisher sia considerata come una variante della GBS, il coinvolgimento del sistema nervoso centrale (CNS) rimane controverso. Alcuni studi riportano la presenza di lesioni infiammatorie nel tronco encefalico, mentre altri non hanno dimostrato alcun coinvolgimento del SNC nella sindrome di Miller-Fisher. Come per altre forme di GBS, nella maggior parte dei casi la sindrome di Miller-Fisher è associata con un'infezione antecedente, suggerendo così che il mimetismo molecolare sia il meccanismo patogenetico determinante. Infezioni antecedenti, in

particolare quelle da *Campylobacter jejuni*, sono associate con la produzione di anticorpi IgG contro i gangliosidi, in particolare contro il ganglioside GQ1b. I gangliosidi GQ1b sono abbondantemente presenti nelle guaine mieliniche paranodali dei nervi extraoculomotori, della giunzione neuromuscolare e dei gangli spinali. Anticorpi IgG anti-GQ1b sono strettamente correlati con la sindrome di Miller Fisher e con caratteristiche cliniche come oftalmoplegia e atassia. Gli effetti neurologici degli anticorpi anti-GQ1b sono indotte dalla distruzione complemento-mediata sia delle cellule di Schwann presinaptiche che dei terminali assonali, con conseguente blocco della giunzione neuromuscolare. Tecniche di *patch-clamp* hanno dimostrato che gli anticorpi anti-GQ1b inibiscono l'afflusso presinaptico di  $Ca^{2+}$  e interagiscono con le proteine dell'apparato esocitotico, interferendo con il rilascio dei neurotrasmettitori e impedendo così l'attivazione dei neuroni postsinaptici: tutto ciò, in ultima analisi, si traduce in debolezza muscolare. Inoltre, il legame di anticorpi anti-gangliosidi con la guaina mielinica paranodale, potrebbe perturbare la giunzione axo-gliale paranodale, con conseguente perdita dei raggruppamenti dei canali ionici e, in ultima analisi, la mancata conduzione. [10]

### **3.6 - DIAGNOSI**

La diagnosi di GBS non è agevole e si avvale, oltre agli aspetti clinici, degli studi sulla conducibilità delle fibre e delle prove cardio-vagali. La non completa affidabilità diagnostica ha condotto molti ricercatori negli ultimi anni a valutare la correlazione tra neuropatie periferiche ed indagini sierologiche per anticorpi anti-

nervo, i più importanti dei quali sono anti-MAG, anti-GM1, anti-GQ1b, anti-Hu e anti-canali del calcio. [7]

Dopo 5-6 giorni dall'esordio, la diagnosi si basa sulla sindrome clinica. Si effettua efficacemente con la rachicentesi (puntura lombare). Nel *liquor*, le proteine sono normali nella prima settimana e si osserva una tendenza a iperproteinorachia nelle settimane successive (dissociazione albumino-citologica: si denotano bande oligoclonali transitorie ed in alcuni pazienti, l'aumento della proteina basica della mielina (*Mielyn Basic Protein*, MBP) e cellule normali con moderata pleiocitosi (aumento del numero di leucociti nel liquido cerebrospinale, causata da processi patologici come l'infiammazione, emorragie e tumori) nell'HIV. I test evidenziatori le anomalie elettrofisiologiche confermano la diagnosi, ma in genere non sono necessari. Nel 60% dei pazienti si osserva rallentamento della velocità di conduzione (VDC) oltre che aspetti di demielinizzazione segmentale all'inizio della comparsa dei sintomi. La latenza dell'onda F, che evidenzia la demielinizzazione prossimale, tende a essere prolungata. [17]

### ***Studi neurofisiologici.***

*Natural Color Sistem* (NCS ) ed elettromiografia (EMG) sono importanti indagini per stabilire la diagnosi di GBS. NCS può sostenere una sospetta diagnosi clinica di GBS, nonché l'individuazione del sottotipo di GBS e contribuisce ad escludere disturbi simili. NCS si basa sull'individuazione di anomalie dei nervi motori per identificare le caratteristiche di demielinizzazione attraverso gli studi di conduzione del nervo sensoriale, contribuendo a differenziare le diverse forme di GBS assonale, quali AMAN e AMSAN. La resa diagnostica della NCS è molto aumentata, permettendo di studiare le caratteristiche di almeno 3 nervi sensoriali e 4 nervi

motori, oltre a onde F e riflessi H. I risultati classici NCS comprendono la presenza di un blocco parziale di conduzione motoria, anomalie della dispersione temporale delle risposte motorie, prolungamento delle latenze delle onde F e riduzione della velocità di conduzione massima del nervo motore. I criteri diagnostici, tipicamente utilizzati per scopi di ricerca, utilizzano una combinazione di questi risultati. Anche se oltre l'85% dei pazienti sottoposti all'NCS rivelano demielinizzazione coerente con la forma AIDP di GBS e, fino al 13% dei casi, l'NCS iniziale è normale, la ripetizione del test da 1 a 2 settimane dopo potrebbe essere necessaria per confermare la diagnosi. NCS può non rilevare i danni dei nervi quando si studiano i pazienti nei primi giorni dall'insorgenza dei sintomi. In questa fase iniziale, l'assenza o il ritardo dei riflessi H del nervo tibiale è un frequente segno neurofisiologico, seguita da anomalie delle risposte delle onde F, con maggiore dispersione temporale del potenziale composto di azione muscolare (*Compound Muscle Action Potential*, CMAP), prolungate latenze del nervo motore distale e delle onde F e riduzione della velocità di conduzione del nervo motore nel settore gamma non demielinizzato. Inoltre, la presenza di onde e riflessi intermittenti anormali può essere una caratteristica precoce di GBS. L'elettromiografia deve essere eseguita per valutare il grado di perdita assonale, ma questo avviene successivamente. [10]

#### ***Esame del liquido cerebrospinale (CSF).***

In aggiunta a NCS e EMG, l'analisi del liquido cerebrospinale (*CerebroSpinal Fluid examination*, CSF) può confermare la diagnosi di GBS. Una concentrazione delle proteine nel CSF è presente nell'80% dei pazienti, associata a numero delle cellule mononucleate a livelli normali (dissociazione albumino-citologica) o <50 cellule/mm. Il CSF può essere normale nella prima settimana di malattia.

Altre indagini che possono essere utili nella diagnosi di GBS sono:

**a. analisi a fini diagnostici:**

- studi di conduzione nervosa ed elettromiografia;
- analisi del liquido cerebrospinale (CSF);
- colture fecali e sierologiche per *Campylobacter jejuni*;
- sierologia per virus HIV, virus dell'Epatite A e B, *Mycoplasma pneumoniae*, Epstein-Barr Virus, e Cytomegalovirus;
- ricerca anticorpi anti-gangliosidi: GQ1b, GM1, GD1a, GT1b;
- controllo vascolare;
- ricerca di anticorpi antinucleari, estrazione anticorpi nucleari , anticorpi anti-neutrofili, concentrazione di eritrociti sedimentari, proteine-C reattive;
- biopsia di nervi e muscoli;
- analisi dei livelli di elettroliti, urea, creatinina;
- glicemia;
- ricerca di porfirine e di urobilinogeno nell'urina e acido delta-amino-levulinico per porfiria nel siero;
- ricerca di medicinali e tossine batteriche;
- analisi dei recettori acetil-alcologici e ricerca di anticorpi anti-tirosinchinasi muscolo-specifici;
- Risonanza Magnetica (MRI) di cervello e spina dorsale.

**b. azioni indicate per la gestione dei pazienti:**

- controllo delle funzioni respiratorie;
- misurazione dei livelli dei gas nel sangue arterioso;
- esecuzione di test delle funzioni polmonari (capacità vitali);

- monitoraggio per iponatremia;
- radiografia del torace;
- elettrocardiogramma (ECG). [10]

### ***Diagnosi differenziale (DD).***

Alcune tossine (per es., fosfati organici) agiscono a livello della giunzione neuromuscolare. La poliomielite acuta, per la quale sono disponibili *test* sierologici, si manifesta in forma epidemica con febbre, malessere e pleiocitosi (*liquor*). Nell'infestazione da zecche del cuoio capelluto si può avere una neuropatia motoria ascendente, soprattutto nei bambini, con perdita dei riflessi profondi e sensibilità conservata. Con l'allontanamento delle zecche, tutti i sintomi si risolvono. [17]

Interessante è lo studio effettuato da alcuni ricercatori tedeschi dell'Università di Warzburg che hanno esaminato gli effetti *in vitro* delle IgG in 11 pazienti con sindrome di Miller-Fisher nel periodo di malattia attiva ed in 3 di questi pazienti dopo recupero della malattia. 9 pazienti erano positivi per anticorpi anti-GQ1b al test Elisa e Dot-blot. Nella fase di guarigione, l'attività bloccante veniva persa ed i sieri che inizialmente erano positivi per gli anticorpi anti-GQ1b diventavano successivamente negativi. È stato riscontrato che anticorpi anti-GQ1b reagiscono anche ai lipopolisaccaridi di *Campylobacter jejuni*: si parla, quindi, di mimetismo molecolare. [7] A proposito della mimica molecolare, lo studio di Nachamkin e colleghi del 1998, determinò che pazienti colpiti da GBS presentavano anticorpi antigangliosidici e che alcuni lipopolisaccaridi di *Campylobacter jejuni* avevano strutture gangliosidiche e gangliosidi moietici del tutto simili a quelli umani presenti su rilevanti siti delle fibre nervose. Questo dato fu confermato da altri studi su pazienti colpiti da GBS, con infezioni post *Campylobacter*, che hanno anticorpi

contro residui glicosidici e antigeni di tipo GAL e NAcGAL, una sequenza di zuccheri presenti nel ganglioside GM1 dell'organismo umano. Questi anticorpi sono presenti sia nei casi assonali che in quelli di demielinizzazione. Alcuni studi dimostrano un'impressionante analogia tra i principali oligosaccaridi di *Campylobacter* (LPS) e un numero di differenti glicosfingolipidi del gruppo gangliosidico nervoso. Altri studi suggeriscono che la struttura antigenica di *Campylobacter jejuni* è in grado di determinare le diverse forme di GBS.

Sebbene certi tipi di *Campylobacter* possono essere implicati nella GBS, alcuni fattori possono giocare un ruolo molto importante nello sviluppo della sindrome. Infatti alcuni gruppi di *Campylobacter jejuni* isolati da pazienti con diarrea contengono gangliosidi GM1 come epitopi, ma questi pazienti non sviluppano anticorpi antigangliosidici. Così come lo sviluppo di anticorpi patogenici può dipendere dall'interazione tra microbi e sistema immunitario.

#### ***Studi sierologici specifici per la diagnosi del Campylobacter jejuni.***

La durata media di escrezione di *Campylobacter jejuni* nelle feci delle persone infette è di solo 16 giorni e vi è da 1 a 3 settimane di scarto temporale tra l'infezione e l'inizio di GBS. La risposta immunitaria alle infezioni di *Campylobacter* è simile ad altre malattie infettive. I livelli di IgG e IgM nel siero aumentano in risposta all'infezione e rimangono elevati da 3 a 4 settimane prima che i valori calino di nuovo, mentre i livelli di IgA nel siero sono presenti durante le prime settimane d'infezione e poi decadono rapidamente. Gli anticorpi IgA possono essere individuati nelle feci e nelle urine di alcuni pazienti con infezione e sono individuabili solo durante la prima settimana dopo l'infezione acuta. Alcuni studiosi hanno trovato che 3 su 17 pazienti con GBS, in una popolazione non controllata,

avevano un'elevata concentrazione di classi diverse di immunoglobuline. Winner e colleghi avevano osservato che il 14% di 99 pazienti con GBS erano positivi a test sierologici del *Campylobacter jejuni*. [13] In un largo studio di casi, Mishu e colleghi hanno valutato 118 pazienti negli Stati Uniti su 113 controlli effettuati, determinando che il 36% dei pazienti con GBS erano positivi a *Campylobacter jejuni*. Inoltre, test sierologici sono stati fatti in alcuni studi giapponesi di pazienti con GBS: il 36% era positivo a *Campylobacter Jejuni*. Con uno studio prospettico, Ho e colleghi hanno dimostrato che le infezioni da *Campylobacter jejuni* sono comuni sia nei pazienti AMAN che nei pazienti AIDP cinesi.

#### ***Sierotipi di Campylobacter associati alla GBS.***

I due maggiori schemi sierotipici del *Campylobacter* usati nel mondo sono "HL" e "0". Lo schema sierotipico HL è originariamente descritto da Lior, che individua oltre 100 sierotipi di *Campylobacter jejuni*, *C. coli* e *C. lari*. Lo schema sierotipico "0" di Penner, invece, individua 60 tipi di *C. jejuni* e *C. coli* ed è basato sull'individuazione di antigeni LPS (lipopolisaccaride).

Gli studi effettuati da Kuroki e colleghi hanno affermato l'associazione tra *Campylobacter* e GBS. Nel suo studio, Kuroki ha isolato *Campylobacter jejuni* da 14 su 46 pazienti con GBS contro solo 6 su 503 soggetti di una popolazione sana. Secondo lo schema 0, 10/12 isolati disponibili avevano lo stesso sierotipo 0:19. Ulteriori studi tuttavia hanno dimostrato che altri sierotipi 0, che si osservano più frequentemente in infezioni non complicate, erano stati isolati da pazienti con GBS. In particolare, gruppi 0:41 sono stati trovati essere frequentemente associati con pazienti GBS in Sud Africa.



Altri studi condotti secondo lo schema sierotipo HL, hanno permesso di trovare altri sottotipi di *Campylobacter jejuni* coinvolti nella GBS. Il sierotipo 0, più specificatamente lo 0:19, oltre che nell'uomo, è anche stato trovato in laboratori animali che includevano cani, gatti e primati. [13]

### **3.7 - PROGNOSI E TERAPIA**

La malattia progredisce in 1-4 settimane (AIDP); nelle successive 4-10 settimane si parla di poliradicolopatia infiammatoria demielinizzante subacuta (SIDP). Nel caso abbia progressione cronica o recidiva si parla di poliradicolopatia infiammatoria demielinizzante cronica (CIDP). Il 10-20% dei pazienti presenta insufficienza cardiaca; a carico di un ulteriore 10-20% dei pazienti residuano *deficit* motori e il 4-15% dei pazienti muore entro il primo anno dopo l'esordio della sindrome. Fino a 1/3 dei pazienti con GBS è costretto a modificare concretamente il suo rapporto con loro lavoro, *hobby* o attività sociali a causa del *deficit* funzionale residuo. Fattori prognostici avversi comprendono: età d'insorgenza della malattia (> 50 anni); grave malattia con depressione profonda dell'attività muscolare, che richiede la ventilazione artificiale; rapida insorgenza della malattia; infezione sia con *Campylobacter jejuni* che da Citomegalovirus, con grave perdita assonale, come dimostrato mediante *test* neurofisiologici ed, eventualmente, perdita di elevati livelli di neurofilamento. [10] Il recupero completo nei primi 12 mesi avviene per il 70% dei pazienti, per arrivare ad 82% nei successivi 12 mesi. Molti pazienti migliorano in un periodo di alcuni mesi; circa il 30% degli adulti e, sempre più bambini, presenta

debolezza muscolare residua a distanza di 3 anni. Le lesioni residue possono richiedere l'applicazione di apparecchi ortopedici o la chirurgia correttiva.

Circa il 3% dei pazienti presenta ricadute dopo un miglioramento iniziale, andando così incontro a polineuropatia recidivante cronica. Le caratteristiche anatomopatologiche e di laboratorio sono simili a quelle della forma acuta, nella quale però la debolezza muscolare è asimmetrica e progredisce molto più lentamente. I nervi possono diventare palpabili a causa di ripetuti episodi di demielinizzazione segmentale e rimielinizzazione. [16]

Il trattamento di pazienti affetti da GBS richiede un approccio multidisciplinare che comprende il monitoraggio e il controllo della frequenza cardiaca e della pressione sanguigna, perché dal 5% al 61% dei pazienti con GBS può subire ampie fluttuazioni della pressione arteriosa e aritmia cardiaca a causa del coinvolgimento autonomico. La sindrome di Guillain-Barré in fase acuta rappresenta un'emergenza medica e richiede un monitoraggio e un supporto costanti delle funzioni vitali, in quanto, circa il 25% dei pazienti GBS richiedono la ventilazione artificiale, che dovrebbe essere applicata quando la capacità vitale scende al di sotto di 15 ml/kg e fino a 20 ml/kg di volume sanguigno; in particolare, si dovranno mantenere pervie le vie aeree. L'apporto di liquidi dovrà essere sufficiente per mantenere un volume urinario di almeno 1-1,5 l/die. In pazienti non deambulanti è importante applicare la profilassi della trombosi venosa profonda con eparina SC e l'utilizzo di calze comprimenti. Altre complicanze che richiedono l'imposizione di un trattamento della fase acuta sono: ritenzione urinaria, disfunzione intestinale e dolore. La stanchezza persistente è un problema frequente nella fase cronica, forse derivante dalla perdita assonale. Gli arti devono essere protetti contro i traumi o le compressioni dovuti alle lenzuola e

alle coperte del letto. [10] Il calore allevia il dolore e permette le prime terapie fisiche; deve essere evitata l'immobilizzazione che può causare anchilosi. Si dovranno praticare subito movimenti passivi ampi delle articolazioni e, non appena le condizioni cliniche lo permettano, anche gli esercizi attivi. La somministrazione di eparina, 5000 U SC 2 volte al giorno, può essere di beneficio per i pazienti. [16] Un programma multidisciplinare di riabilitazione, compreso l'impiego di un fisioterapista e di un terapeuta occupazionale, è un aspetto importante della terapia. I pazienti possono eventualmente affidarsi ad un'organizzazione di sostegno ai pazienti come, per esempio, la *GBS / CIDP International Foundation* o la *Association of Guillain-Barrè Syndrome of New South Wales*, le quali forniscono entrambe informazioni e sostegno alle persone colpite da GBS. [10] (v. allegato, pag. 176)

I corticosteroidi peggiorano la prognosi della GBS e non devono essere utilizzati, in genere manifestano, reazioni di intolleranza che possono talora portare ad aritmie (disturbi del ritmo della frequenza cardiaca) e, occasionalmente, anche un aumento sostanziale della pressione arteriosa, nei pazienti che già soffrono di ipertensione. Possono, inoltre, insorgere stati di agitazione, ansia ed insonnia. Rari, ma descritti, sono episodi di crisi epilettiche. La comparsa di necrosi ossea, sebbene spesso conseguenza delle alte dosi, ma estremamente rara. Complessivamente, il trattamento con alte dosi di corticosteroidi può essere considerato sicuro e utilizzato solo nelle fasi acute (riacutizzazioni) anche se non dovrebbe essere presa in considerazione in pazienti con aritmia, disturbi renali gravi o epilessia. Infine, gli steroidi hanno un effetto leggermente euforizzante: i pazienti riferiscono, in genere, di sentirsi meglio dopo l'assunzione di steroidi e pertanto richiedono spesso la

somministrazione regolare di steroidi, ma questo atteggiamento non è consigliabile, per la frequenza degli effetti collaterali sopra citati. [14]

### ***Immunoterapia.***

Si basa sulla plasmateresi e sulla somministrazione di immunoglobuline per via endovenosa (IVIg) La plasmateresi è stata considerata il miglior trattamento standard per la GBS per quasi 20 anni. In 4 studi che includevano complessivamente 585 pazienti, la plasmateresi ha determinato un significativo miglioramento delle caratteristiche cliniche entro 4 settimane dalla randomizzazione, come indicato da un miglioramento della disabilità e dall'aumento della percentuale di pazienti sottoposti alla cura che riacquistano la forza completa entro 1 anno dall'applicazione della terapia. [20] In ulteriori 5 studi eseguite su 623 pazienti, la plasmateresi ha ridotto dal 27% al 14% la percentuale di pazienti che necessitano di ventilazione assistita in 4 settimane. La plasmateresi è stata utile entro 4 settimane dall'inizio dei sintomi e il vantaggio maggiore si è avuto quando il trattamento è stato dato fin dall'inizio. Il regime normale permette lo scambio da 4 a 6 volumi di plasma dopo 2 settimane, ma la cura con 4 trattamenti di plasmateresi è più efficace rispetto a quella ogni 2 settimane. La plasmateresi si è rivelata essere un trattamento sicuro ed i costi connessi sono recuperati dai risparmi ottenuti dalla riduzione di terapia intensiva e degenza in ospedale.

Nel 1992 un gruppo olandese ha dimostrato che la somministrazione di immunoglobuline per via endovenosa (IVIg) è stata efficace quanto la plasmateresi nel trattamento della GBS. Successivamente, altri 4 studi controllati, eseguiti su un totale di 536 soggetti, hanno dimostrato un'efficacia pari tra il trattamento con IVIg e con plasmateresi in termini di riduzione della durata della ventilazione meccanica, di

miglioramento della disabilità a 4 settimane, di riduzione della disabilità residua ed inoltre nel prevenire la morte. Prove con IVIg combinate sia con la plasmateresi che con l'immunoassorbimento non hanno dimostrato benefici aggiuntivi rispetto al trattamento con le sole IVIg. [10] Nella neuropatia ricorrente cronica, i corticosteroidi migliorano il deficit di forza e possono risultare necessari per molto tempo. I farmaci immunosoppressori (azatioprina) e la plasmateresi giovano ad alcuni pazienti. [16]

### ***Studi sulle possibili terapie della GBS.***

#### **a. Effetti preventivi e curativi di ciclofosfamide (CY) in animali con GBS indotta.**

Il Ciclofosfamide (CY) è un agente immunosoppressivo: in questo studio, CY viene testato in ratti nei quali è stata indotta una neurite autoimmune sperimentale (EAN), praticamente un tipo di GBS da laboratorio. La profilassi con CY (2 somministrazioni il giorno0 ed il giorno14 post-immunizzazione) sembra determinare un significativo miglioramento nella prevenzione dei sintomi clinici e istologici della EAN nei nervi sciatici locali e periferici; inoltre, riduce la presenza di citochine e di NF-kB p65 nel tessuto nervoso. Quando CY viene somministrato ad uso terapeutico (1 singola somministrazione il giorno14 post-immunizzazione) in ratti con la malattia conclamata, gli effetti benefici provocati si limitano ai soli sintomi clinici e non influenzano gli altri parametri. Entrambi i trattamenti con CY, profilattico e terapeutico, modulano le risposte specifiche delle cellule T. Si osserva, inoltre, un picco dei sintomi clinici della malattia al 20esimo giorno p.i. associato con il decorso clinico della EAN, ossia con l'infiltrazione di cellule mononucleate e il danno della guaina mielinica dei nervi sciatici, con la produzione locale di IFN- $\gamma$ ,

TNF- $\alpha$  e IL-4, e con il contenuto e l'attivazione dell'NF-kB nucleare nei nervi sciatici. Complessivamente, è difficile capire nello specifico i meccanismi molecolari che apportano significativi miglioramenti durante il trattamento clinico con somministrazione di CY. Una teoria sostiene una *downregulation* delle risposte immunitarie periferiche e locali che può produrre effetti clinici e visibili senza evidenti modifiche istologiche o immunologiche. Per esempio, CY probabilmente induce la soppressione della produzione locale di mediatori chimici pro-infiammatori della mielina, come ossido nitrico, radicali liberi e vari composti dell'ossigeno. La loro riduzione può migliorare le funzioni della mielina, contemporaneamente all'assenza di alterazioni istologiche e quantitative. Questa teoria si basa sul fatto che un effetto noto di CY è che impedire la differenziazione delle cellule B in plasmacellule Ig-secerenti (*Shiraki e Fujiwara, 1984*), in assenza di alterazioni istologiche o dei parametri immunologici. Il ciclofosfamide è un agente alchilante ed immunosoppressivo usato nella chemioterapia di disturbi maligni immunoinfiammatori o autoimmuni, incluso forme progressive e particolarmente rapide di sclerosi multipla (*Multiple Sclerosis, MS*), infiammazioni dell'intestino e di *lupus* eritematoso sistemico (*review da Ahmed e Hombal, 1984; Colvin, 1999*). Il limite principale dell'uso prolungato di CY riguarda gravi effetti collaterali durante le terapie prolungate, incluso la comparsa di infezioni e lo svilupparsi di malattie neoplastiche. I dati clinici presentati forniscono una solida base per effettuare studi ulteriori per valutare l'effettivo potenziale di questa medicina nel trattamento dell'AIDP. Studi futuri si potrebbero occupare di dimostrare che CY può diminuire la durata delle malattie infiammatorie e che, come dimostrato in questo studio su ratti

sperimentalmente indotti, un trattamento di breve durata con CY può portare beneficio a pazienti affetti da AIDP. [15]

**b. La somministrazione di DHEA migliora le neuriti autoimmuni in ratti di Lewis.**

Il deidroepiandrosterone (DHEA) è uno steroide surrenale (C19), precursore di androgeni ed estrogeni, nonché abbondantemente presente nel siero umano; è una molecola dotata di proprietà antinfiammatorie, anti-proliferative e, in parte, immuno-regolatrici. In questo studio, viene somministrato DHEA SC a ratti di Lewis immunizzati con proteina basica della mielina di bovino (*Bovine Myelin Protein*, BMP). I ratti trattati con DHEA hanno dimostrato decremento significativo dell'infiltrazione di cellule infiammatorie nel sistema nervoso periferico (SNP). Questo risultato si spiega con un significativo calo del numero di cellule secernenti IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  a livello di SNP; inoltre, BMP stimola la proliferazione delle cellule T e la secrezione di IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nelle cellule della milza. Nessuna differenza significativa per quanto riguarda IL-10 è stata osservata fu trovata fra il gruppo trattato e i gruppi di controllo. Il trattamento dei ratti affetti da EAN a basse dosi di DHEA (2 mg) ha sensibilmente migliorato i sintomi clinici. Questi risultati suggeriscono che DHEA può migliorare il decorso delle neuriti autoimmuni, sopprimendo la proliferazione di cellule T autoreattive e l'espressione di citochine pro-infiammatorie. Nell'uomo molte patologie infiammatorie croniche sono associate con bassi livelli sierici di DHEA; in particolare, nel *lupus* eritematoso sistemico (SLE) il trattamento con DHEA esogeno induce un considerevole miglioramento sul decorso clinico della malattia, con ridotta necessità del ricorso a glucocorticoidi per la terapia. Considerando quindi l'utilizzo di DHEA nella terapia

di patologie autoimmuni, DHEA potrebbe essere utilizzato anche nel trattamento di EAN. In questo studio, sono stati confermati gli effetti terapeutici del DHEA sulla fase iniziale di EAN, influenzando sui parametri clinici, istopatologici e immunologici. [16]

### **3.8 - IMPATTO ECONOMICO DELLA GBS**

Non si hanno molti dati certi per quanto riguarda l'impatto economico della GBS, ma uno studio effettuato su pazienti colpiti dalla sindrome di Guillain-Barrè degenti presso il *Taipei Veterans General Hospital* di *Taiwan*, prima, ed uno studio americano poi, hanno chiarito le idee sull'ampiezza economica del fenomeno, in attesa che dati più precisi vengano stimati.

I risultati, resi noti nel marzo 2008, dello studio americano condotto dal dr. Frenzen, ricercatore presso il Dipartimento dell'Agricoltura Statunitense, hanno determinato che il costo annuale della GBS per le casse dei contribuenti americani, è valutato intorno ai 1.7 miliardi di dollari (95% CI, \$1.6 a 1.9 miliardi di dollari), inclusi 0.2 miliardi di dollari (14%) in costi medici e diretti, e 1.5 miliardi di dollari (86%) in costi indiretti. La maggior parte dei costi medici erano associati alle degenze negli ospedali pubblici. La maggior parte dei costi indiretti erano dovuti alle morti premature. Il costo medio per paziente americano affetto da GBS è di 318,966 dollari (95% CI, \$278,378 a 359,554). [17]

Lo studio dei ricercatori del *Taipei Veterans General Hospital* di *Taiwan* invece, mirava a comprendere quale tecnica, tra la plasmateresi e le immunoglobuline per via endovenosa, comportava minori costi a parità di efficacia,



ma può dare l'idea di quale sia l'entità della spesa della quale si deve far carico il Servizio Sanitario per ogni paziente colpito da GBS.

Secondo lo studio, i fattori che influenzano la scelta della terapia per la cura della GBS, includono il costo delle medicine e l'efficacia dell'intervento. Oggi le procedure più comuni usate per trattare GBS contemplano plasmateresi (PE) e iniezione endovenosa di immunoglobulina (IVIg). Dato che IVIg e PE sono ugualmente efficaci, una strategia di riduzione del costo sarebbe appropriata. Nei pazienti affetti da GBS, si dovrebbe tener conto delle considerazioni cliniche ed economiche nella scelta fra le varie opzioni di trattamento. Il modello "Farma-Economico" viene usato per valutare, predire e comparare i costi e le conseguenze di diversi trattamenti nella pratica clinica. Ne è risultato che il costo delle medicine e dei costi totali nel gruppo trattato con le IVIG era più alto di quello osservato nel gruppo trattato con PE. (v. Tab. n.8). [18]

Variabili dei costi	PE (n=10)		IVIg (n =7)		Gruppo di Controllo(n=7)		p-value
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	
<b>Medicinali</b>	4051,94	1614,54	6805,22	1929,73	1535,19	1929,73	0,013
<b>Procedure</b>	3849,07	666,45	1203,58	796,56	1740,53	796,56	0,003
<b>Ospedalizzazione</b>	7542,47	1557,37	2762,06	1861,43	3087,25	1861,43	0,012
<b>Totale</b>	15443,49	3427,25	10770,86	4096,35	6363,01	4096,35	0,022

**Tab. n.8:** stima della media dei costi del Kruskal-Wallis test. [18]

Ci furono 3 pazienti con complicazioni (2 polmonite e 1 setticemia) nel gruppo trattato con PE. Nel gruppo trattato con IVIG solamente un paziente aveva complicazioni (polmonite). L'analisi della covarianza (ANOVA) per costi di medicazione, ha mostrato che nell'interazione tra PE e IVIG le complicazioni erano

un fattore statisticamente significativo ( $p = 0.013$ ). La differenza nel numero di complicazioni non era statisticamente significativa, ma i costi non erano uguali tra i trattamenti con PE o IVIG dei gruppi di pazienti con complicazioni e quelli senza complicazioni. C'erano più complicazioni nel gruppo di PE che nel gruppo di IVIG: complicazioni collegate con i costi più alti ma non staticamente significativi. L'ANOVA per i costi totali mostra che l'interazione dell'effetto di PE o IVIG e le complicazioni non era statisticamente significativa ( $p = 0.183$ ). (Tabb. n.9 e n.10). Ovviamente, il costo medio totale era più alto in pazienti che avevano bisogno della ventilazione assistita, rispetto a quelli che non la richiedevano ( $p = 0.008$ , t-test) (Tabella 7). [18]

Gruppi	Con complicazioni				Senza complicazioni			
	N	Media	SD	SEM	n	Media	SD	SEM
<b>PE</b>	3	29 864,13	15 818,85	17 242,06	7	9 263,22	3 994,01	3 501,16
<b>IVIG</b>	1	16 501,43	-	-	6	9 815,75	4 160,72	4 007,26

**Tab. n.9:** costi totali delle complicazioni dei gruppi trattati con PE e IVIG. [18]

Gruppi	Con complicazioni				Senza complicazioni			
	N	Media	SD	SEM	n	Media	SD	SEM
<b>PE</b>	3	12 227,98	8 409,91	7 059,83	7	547,95	541,02	207,1
<b>IVIG</b>	1	6 392,0	-	-	6	6 874,08	2 258,80	2 806,33

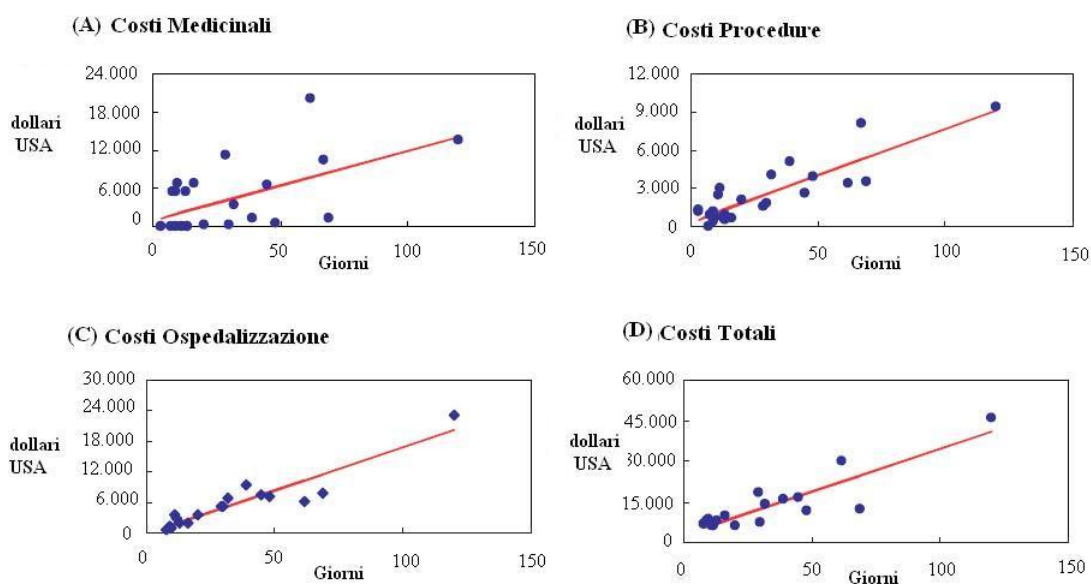
**Tab. n.10:** Costo dei medicinali per pazienti con e senza complicazioni dei trattamenti con PE e IVIG. [18]

Ventilazione assistita	n	Media	SD	SEM

NO	17	61 133,79	4 031,7	977,83
SI	7	24 299,64	12 343,65	4 665,46

**Tab. n.11:** confronto dei costi in pazienti con e senza ventilazione assistita. [18]

Sia il metodo Pearson sia lo Spearman, hanno mostrato che, secondo la correlazione appaiata, costi variabili e degenza in ospedale hanno una relazione lineare e significativa. Ciò rivela anche che i coefficienti correlativi non erano significativi tra età e momento del picco dei sintomi e altre variabili; di conseguenza, età e momento del picco dei sintomi, non hanno effetto sulle variabili del costo, incluso il costo totale. Di contro, invece, la lunghezza dell'ospedalizzazione mostrò una forte correlazione con il costo totale (coefficiente della correlazione di Pearson = 0.907). Questo risultato può essere più accuratamente descritto da semplici analisi di regressione lineare. La Tabella 9, mostra inoltre che ogni giorno supplementare di ospedalizzazione aumenta il costo in media di \$5599 NT (*New Taiwan Dollars*) equivalente a 167,13 dollari americani (US\$1.00 = NT\$33.50 nel 2005). Secondo il *fitted regression model* ogni giorno supplementare di degenza aumenta il costo totale con una media di \$10507,5 NT (313,65 dollari americani). I costi dei giorni di ospedale con procedure, ospedalizzazione e costo totale erano strettamente correlati ( $R\text{-square} > 0.750$ ), mentre i giorni di ospedale e la somministrazione di medicine erano relativamente poco correlati ( $R\text{-square} > 0.296$ ) (v. Fig. n.9). Negli Stati Uniti i costi per la cura della GBS per paziente sono stati valutati intorno ai 110.000 dollari per le cure di salute diretta e 360.000 dollari per la mancata produttività.



**Fig. n.9:** esempio di regressione lineare dei costi variabili dall'inizio della degenza ospedaliera. [18]

In uno studio scandinavo che compara la cura con plasmateresi a terapie d'appoggio, il costo della PE era più alto del risparmio derivante, in termini di costi della salute pubblica, nel caso di una breve degenza in un ospedale.

Conclusioni simili sono derivate nel Regno Unito. Per i pazienti con GBS non molto grave, uno studio calcolò che quattro dosi di PE sono più economiche di due. I dati relativi ai costi farmacologici furono ottenuti, in questo studio retrospettivo, dalla terapia della GBS con PE e IVIG al *Taipei Veterans General Hospital*.

Lo studio mostrò che, sebbene i costi delle immunoglobuline fossero più alti, i costi totali erano più bassi in questo gruppo rispetto al gruppo curato tramite la plasmateresi. I costi alti, del gruppo trattato con plasmateresi, erano collegati alle complicazioni derivanti e alla conseguente ventilazione assistita. Infatti, i pazienti nel gruppo trattato con IVIG ebbe meno complicazioni e meno bisogno di ventilazione assistita, con conseguente minor costo per le cure.

In conclusione l'analisi dei costi farmacologici, dimostra che nonostante i costi elevati della terapia della sindrome di Guillain-Barrè con immunoglobuline, quest'ultime mostrano una riduzione statisticamente significativa del costo totale vista la ridotta degenza ospedaliera, costi più bassi per le procedure e l'ospedalizzazione, meno complicazioni e minor numero di pazienti con bisogno di ventilazione assistita, rispetto al gruppo trattato con plasmateresi. La riduzione del costo può essere ottenuto soprattutto da una prospettiva medica, ma può venire anche da una prospettiva dei costi farmacologici. [18]

## **CAP. 4 - LEGISLAZIONE**

### **4.1 - LEGISLAZIONE RIGUARDANTE I MICROORGANISMI PRESENTI NEGLI ALIMENTI**

*Alberto Zancanaro*

#### **SICUREZZA ALIMENTARE.**

La globalizzazione della catena alimentare fa emergere costantemente nuove sfide e rischi per la salute e gli interessi dei consumatori europei. L'obiettivo centrale della politica di sicurezza alimentare dell'Unione Europea consiste nel raggiungere i massimi livelli di tutela della salute e degli interessi dei consumatori in relazione ai prodotti alimentari. Per realizzare tale obiettivo, l'UE intende garantire la sicurezza e l'adeguata etichettatura dei prodotti alimentari, tenendo conto della loro diversità (compresi i prodotti tradizionali) e assicurando allo stesso tempo il corretto funzionamento del mercato interno. A tal fine, l'UE ha messo a punto un pacchetto completo di provvedimenti legislativi in materia di Sicurezza Alimentare, che viene costantemente verificato e adattato ai nuovi sviluppi. Tali provvedimenti si fondano sull'analisi dei rischi. L'istituzione dal Regolamento (CE) n.178/2002 dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA), che fornisce consulenze scientifiche indipendenti sui rischi esistenti ed emergenti, ha apportato un contributo fondamentale in termini di sostegno alle attività svolte dalle istituzioni dell'UE a tutela dei consumatori europei in questo settore.

Il principio guida della politica dell'UE in materia di sicurezza dei prodotti alimentari consiste nell'applicazione di un approccio integrato "dal produttore al consumatore", tenendo conto di tutti i settori della catena alimentare: produzione di mangimi, aspetti fitosanitari e veterinari, benessere degli animali, produzione primaria,

trasformazione, immagazzinamento e trasporto degli alimenti, vendita al dettaglio, importazione ed esportazione. Questo approccio globale e integrato, nel quale le responsabilità degli operatori del settore alimentare (OSA) e delle autorità competenti sono espressamente definite, è sinonimo di una politica alimentare più coerente, efficace e dinamica. [26, 28]

## **REGOLAMENTO (CE) 178/2002: PRINCIPI GENERALI DELLA LEGISLAZIONE ALIMENTARE IN EUROPA.**

Il Regolamento (CE) n.178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, inoltre istituisce l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e fissa le procedure nel campo della Sicurezza Alimentare.

Il punto cardine di questo regolamento è ottenere un approccio completo ed integrato della legislazione alimentare e quindi prendere in considerazione tutti gli aspetti della catena di produzione alimentare a partire dalla produzione, compresi punti di trasformazione, confezionamento e distribuzione del prodotto alimentare, fino alla fornitura dei prodotti al consumatore finale. In tutte le fasi di questa catena, la responsabilità primaria e giuridica del controllo della sicurezza dei prodotti alimentari ricade sugli OSA che hanno prodotto, allevato, trasformato o distribuito il prodotto finale o i suoi ingredienti. Un sistema analogo deve applicarsi agli esercenti del settore dell'alimentazione animale.

La legislazione alimentare si prefigge inoltre altri obiettivi, tra cui:

- protezione della vita e della salute dei cittadini e degli interessi dei consumatori, della salute e del benessere degli animali, ma anche delle piante e dell'ambiente;

- ottenere la libera circolazione all'interno della Comunità Europea dei prodotti alimentari e degli alimenti per animali;
- considerazione delle norme internazionali esistenti o in fase di elaborazione.

La legislazione alimentare si basa essenzialmente sull'analisi dei rischi fondata sulle prove scientifiche disponibili. In virtù del principio di precauzione, gli Stati membri della Comunità Europea e la Commissione possono adottare misure provvisorie e adeguate di gestione del rischio nel caso in cui una valutazione della rispettiva Autorità riveli la probabilità che si verifichino effetti nocivi per la salute umana e animale o nei casi di incertezza scientifica.

#### ***Disposizioni generali della legislazione alimentare.***

In linea generale la legislazione, per tutelare la salute umana ed animale, non permette la commercializzazione di nessun prodotto alimentare se ritenuto pericoloso: vale a dire se è nocivo per la salute e/o non adatto al consumo o se non è possibile ottenere la certezza scientifica di non pericolosità. Nel caso in cui un prodotto alimentare rischioso per la salute umana è entrato in commercio, tutto il lotto di cui fa parte è ritenuto pericoloso e quindi va sottratto al consumo umano. Analoghi principi vengono adottati per il mercato o per la somministrazione di alimenti ad animali produttori di derrate alimentari, qualora siano ritenuti pericolosi. Un alimento per animali è pericoloso se ha un effetto altrettanto rischioso per la salute animale o, in ultima analisi, umana.

In tutte le fasi della catena alimentare, gli operatori controllano che i prodotti alimentari o gli alimenti per animali corrispondano alle disposizioni della legislazione alimentare e verificano l'osservanza delle prescrizioni. Gli Stati membri controllano l'applicazione di detta legislazione, verificandone il rispetto da parte degli operatori e definiscono misure e sanzioni applicabili in caso di violazione.



La tracciabilità dei prodotti alimentari, degli alimenti per animali, degli animali produttori di derrate alimentari e di qualsiasi altra sostanza introdotta nei prodotti alimentari viene accertata in tutte le fasi di produzione, trasformazione e distribuzione. A questo scopo gli operatori dei settori interessati mettono a punto sistemi e procedure che ne consentano la tracciabilità. [27]

Inoltre è stato necessario definire altri principi generali per mantenere elevati *standard* di tutela della salute del consumatore. In particolare:

- valutazione dei rischi riguardanti la sicurezza degli alimenti e dei mangimi, mediante il lavoro dell'EFSA, riguardante la valutazione della sicurezza alimentare e dei mangimi;
- Etichettatura e alimentazione, mediante la legislazione UE per dare ai consumatori informazioni complete sul contenuto e sulla composizione degli alimenti;
- sicurezza biologica degli alimenti, mediante la politica UE per affrontare i rischi biologici causati da batteri, virus o prioni negli alimenti;
- sicurezza chimica degli alimenti, mediante la legislazione UE sulla sicurezza chimica dei prodotti alimentari;
- buone prassi di laboratorio, stabilendo criteri UE per la promozione della qualità e della validità dei dati sui test chimici. [26]

## **IL REG. (CE) 2073/05 SUI CRITERI MICROBIOLOGICI APPLICABILI AI PRODOTTI ALIMENTARI.**

Il Regolamento che specificamente riguarda i microrganismi nei prodotti alimentari è il Regolamento CE n.2073/2005 della Commissione del 15 novembre

2005. Esso per la prima volta armonizza a livello europeo i criteri microbiologici che sino ad oggi erano stati formulati dai singoli Stati dell'Unione.

Il Regolamento CE n.2073/2005 è un dispositivo di legge modellabile, in quanto vi sono sempre continui aggiornamenti scientifici nel settore delle analisi microbiologiche sugli alimenti. I criteri microbiologici contenuti in tale regolamento non sono dei limiti di carica microbica come quelli emanati sinora. Sono dei criteri, appunto, ossia dei parametri che il legislatore ha ritenuto opportuni rilevare per alcuni gruppi di prodotti alimentari. Questi criteri servono agli OSA per validare il proprio programma HACCP e per avere una spia indiretta dell'efficacia del funzionamento del programma stesso.

Tali criteri sono destinati senza alcun dubbio agli OSA. L'Autorità sanitaria competente per i controlli ufficiali ha il compito di vigilare e verificare che l'OSA rispetti tali criteri, di prodotto e di processo.

Il Regolamento CE n.2073/05 è incentrato nel fissare i criteri di sicurezza microbiologica e di igiene dei processi di produzione dei prodotti alimentari e non solo. Infatti, l'OSA stesso deve predisporre, attuare e mantenere una o più procedure permanenti, basate sui principi del sistema HACCP, per osservare le norme d'igiene a tutti i livelli della catena alimentare. In altri termini con tale Regolamento il legislatore comunitario ha inteso fissare dei veri e propri limiti critici nell'ottica della metodologia dell'HACCP; limiti che sono in alcuni casi limiti di prodotto e in altri limiti di processo. [19, 20]

#### ***Pericoli non previsti dal Regolamento CE n.2073/05.***

Gli alimenti consumati dall'uomo possono causare malattia alimentare anche perché contengono microrganismi, parassiti o residui di composti chimici che non sono stati sinora presi in considerazione dalla Normativa Europea. Per quanto

riguarda in particolare i pericoli microbiologici, ad esempio il problema *Campylobacter spp.*, bisognerà fare riferimento alla normativa presente in Italia, laddove i parametri siano stati previsti. [19]

L'Unione Europea sta comunque cercando di far fronte alla mancanza di dati quantitativi riguardanti il genere *Campylobacter* in modo da poter procedere alla stesura di una normativa più precisa che affronti questo problema sempre più emergente. Proprio nel 2005, anno di stesura del Reg. CE 2073/05, la volontà della Comunità di affrontare il problema *Campylobacter* venne evidenziata dalla richiesta della Commissione di un Parere ad un gruppo di esperti scientifici dell'EFSA sui pericoli biologici relativi alla presenza di *Campylobacter* negli animali e negli alimenti. Inoltre, tale interesse appare anche dalla relazione dell'EFSA/CEPCM (Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie) del 2009, relativa ai dati del 2007, dove si dichiara che le infezioni da *Campylobacter spp.* hanno continuato a costituire la zoonosi più frequentemente segnalata nell'uomo in tutta l'Unione Europea: ben 200.507 casi rispetto ai 175.561 dell'anno precedente, ossia un aumento complessivo del 14,2% in un anno. La Relazione 2007 sulle zoonosi mostra che molti batteri vengono ancora trasmessi dagli animali ai nostri alimenti. La diminuzione dei casi di salmonellosi, probabilmente grazie alle misure di controllo adottate lungo tutta la catena alimentare, costituisce un dato positivo; *Campylobacter* e *Listeria* negli alimenti costituiscono ancora motivo di preoccupazione e rimangono l'obiettivo delle prossime azioni a livello comunitario per garantire la tutela della salute umana. Non va dimenticato, comunque, che nel complesso del Pacchetto Igiene i criteri microbiologici sono fissati anche dai Regolamenti CE n.853/04 e n.854/04 e, se rispettati, riducono notevolmente i pericoli di infezione da batteri, compresi quelli da *Campylobacter*.

Un punto importante che emerge nell'applicazione del Reg. CE n.2073/05 è il ruolo sempre maggiore che avranno i *challenge test*, ossia le prove di inoculazione sperimentale di uno o più microrganismi in un determinato substrato alimentare. Lo scopo di queste prove è quello di valutare con la maggior precisione possibile l'effetto che dell'alimento su di un microrganismo pericoloso per la salute umana, così da poterne prevenire le conseguenze in caso di inquinamento. [29]

## **CONCLUSIONE**

Come infine appare evidente, il perno del Regolamento CE n.2073/05 non sono i criteri microbiologici in sé: i criteri sono stati fissati per separare la condizione di "normalità" da quella di "deviazione", così come prevede il concetto di limite critico nell'HACCP. In altre parole, i criteri di sicurezza di prodotto sono dei parametri grazie ai quali l'OSA può stabilire se il proprio processo produttivo è sotto controllo o meno. E l'Autorità sanitaria, dal canto suo, verificando in concreto che le partite di prodotto rispettano i suddetti criteri di sicurezza, non valutano in senso stretto la salubrità del prodotto, ma piuttosto controllano, per interposta persona, che il processo produttivo dell'OSA sia sempre sotto controllo.

In altri termini il Reg. CE n.2073/05 apparentemente focalizza l'attenzione sui microrganismi, ma in realtà assegna un ruolo determinante:

- a. alle procedure di HACCP e/o all'applicazione delle Buone Prassi Igieniche di Lavorazione, per tenere sotto controllo il livello igienico di produzione;
- b. agli alimenti in sé, non più visti come veicolo passivo di trasporto di microrganismi pericolosi per la salute umana, bensì come protagonisti attivi (in senso positivo o negativo) dell'eventuale sviluppo dei microrganismi. [19]

## **4.2 - LEGISLAZIONE RIGUARDANTE LE MALATTIE RARE**

*Enrico Fabrin*

In Europa è stato adottato per il periodo 1° gennaio 1999 - 31 dicembre 2003 il Programma d'Azione Comunitaria sulle cosiddette malattie rare, concernente anche le malattie genetiche. Secondo questo programma, si definiscono “malattie rare” quelle che presentano una prevalenza uguale o inferiore a 5 casi ogni 10.000 persone nella UE. Se da un lato una prevalenza del 5/10.000 può apparire bassa, dall'altro occorre ricordare che ognuna di queste malattie colpisce 246.000 persone nell'UE a 27 Stati membri (UE27). [21]

La legislazione concernente le malattie rare in Italia si occupa soprattutto dell'individuazione delle malattie per cui è prevista l'esenzione dal pagamento del *ticket* sanitario. Il Ministero della Sanità, infatti, ha emanato il D.L.vo 18 maggio 2001, n.279, che istituisce la Rete Nazionale delle malattie rare e stabilisce il diritto di esenzione dalla partecipazione al costo delle relative prestazioni sanitarie; oltre a ciò, esso redige ed integra con cadenza triennale, un vero e proprio elenco di malattie che si possano definire rare, e che quindi godono di diritti particolari (art.4). Questi consistono nell'esenzione parziale o totale del pagamento dei farmaci e dell'assistenza specialistica, comprese prestazioni specialistiche, di diagnostica strumentale e di laboratorio e di fisioterapia. La sindrome di Guillain-Barrè (GBS) non è contemplata nella lista delle malattie rare, probabilmente per il decorso relativamente breve che ha, ma lo Stato sostiene i pazienti affetti da forma cronica della GBS, ossia quelli affetti da Polineuropatia Cronica Infiammatoria Demielizzante, nota con la sigla CIDP, citata nel Cap.6 della lista: Malattie del Sistema Nervoso e degli Organi di Senso (cod. ICD9-CM da 320 a 389) – RF0180.

Il D.L.vo 279/01 descrive, mediante una serie di articoli, inoltre, i vari aspetti delle malattie rare.

L'**Articolo 1** disciplina le modalità di esenzione dalla partecipazione al costo delle malattie rare per le correlate prestazioni di assistenza sanitaria incluse nei livelli essenziali di assistenza (attuazione art.5 D.L.vo 29 aprile 1998, n. 124) e individua specifiche forme di tutela per i soggetti affetti dalle suddette malattie.

L'**Articolo 2** istituisce la Rete Nazionale per la prevenzione, la sorveglianza, la diagnosi e la terapia delle malattie rare. La Rete è costituita da presidi accreditati, individuati tra quelli in possesso di documentata esperienza di attività diagnostica o terapeutica specifica per le malattie o per i gruppi di malattie rare, nonché di idonea dotazione di strutture di supporto e di servizi complementari, ivi inclusi, per le malattie che lo richiedono, servizi per l'emergenza e per la diagnostica biochimica e genetico- molecolare.

Il Ministro della Sanità provvede all'individuazione dei Centri Interregionali di riferimento, uno per bacino territoriale di competenza. Essi devono provvedere allo svolgimento delle seguenti funzioni:

- a) gestione del Registro Interregionale delle malattie rare, coordinata con i registri territoriali ed il Registro Nazionale di cui all'art.3;
- b) scambio delle informazioni e della documentazione sulle malattie rare con gli altri Centri Interregionali e con gli organismi internazionali competenti;
- c) coordinamento dei presidi della Rete, al fine di garantire la tempestiva diagnosi e l'appropriata terapia, qualora esistente, anche mediante l'adozione di specifici protocolli concordati;

- d) consulenza ed il supporto ai medici del Servizio Sanitario Nazionale in ordine alle malattie rare ed alla disponibilità dei farmaci appropriati per il loro trattamento;
- e) collaborazione alle attività formative degli operatori sanitari e del volontariato ed alle iniziative preventive;
- f) informazione ai cittadini ed alle associazioni dei malati e dei loro familiari in ordine alle malattie rare ed alla disponibilità dei farmaci.

Notevole importanza riveste l'**Articolo 3** che istituisce il Registro Nazionale, al fine di consentire la programmazione nazionale e regionale degli interventi volti alla tutela dei soggetti affetti da malattie rare e di attuare la sorveglianza delle stesse. Il Registro Nazionale delle malattie rare è istituito presso l'Istituto Superiore di Sanità. Il Registro raccoglie dati anagrafici, anamnestici, clinici, strumentali, laboratoristici e relativi ai fattori rischio e agli stili di vita dei soggetti affetti da malattie rare, a fini di studio e di ricerca scientifica in campo epidemiologico, medico e biomedico ed è funzionalmente collegato con i Registri Interregionali e territoriali e, ove esistenti, con i registri internazionali.

L'**Articolo 4**, come sopra citato, reca l'elenco delle malattie e dei gruppi di malattie rare per le quali è riconosciuto il diritto all'esenzione dalla partecipazione al costo per le correlate prestazioni di assistenza sanitaria; inoltre, a ciascuna malattia o gruppo di malattie è associato uno specifico codice identificativo.

L'**Articolo 5** descrive la diagnosi della malattia e riconoscimento del diritto all'esenzione.

L'assistito per il quale sia stato formulato da un medico specialista del Servizio Sanitario Nazionale il sospetto diagnostico di una malattia rara inclusa nell'*Allegato I* viene indirizzato dallo stesso medico, in base alle indicazioni del competente

Centro Interregionale di riferimento, ai presidi della Rete in grado di garantire la precisa diagnosi della specifica malattia o del gruppo di malattie. I presidi della Rete assicurano l'erogazione in regime di esenzione dalla partecipazione al costo delle prestazioni finalizzate alla diagnosi e, qualora necessarie ai fini della diagnosi di malattia rara di origine ereditaria, le indagini genetiche sui familiari dell'assistito. I relativi oneri sono a totale carico dell'Azienda Unità Sanitaria Locale di residenza dell'assistito. Ancora, i presidi della Rete comunicano ogni nuovo caso di malattia rara accertato al Centro di riferimento competente, secondo le modalità, in appositi disciplinari tecnici predisposti dall'Istituto Superiore di Sanità.

L'assistito cui sia stata accertata da un presidio della Rete una malattia rara inclusa nell'*Allegato 1* può chiedere il riconoscimento del diritto all'esenzione all'Azienda Unità Sanitaria Locale di residenza, allegando la certificazione rilasciata dal presidio stesso.

L'**Articolo 6**, riguardante le modalità di erogazione delle prestazioni mediche, specifica che l'assistito riconosciuto esente ha diritto alle prestazioni di assistenza sanitaria, prescritte con le modalità previste dalla normativa vigente, incluse nei livelli essenziali di assistenza, efficaci ed appropriate per il trattamento ed il monitoraggio della malattia dalla quale è affetto e per la prevenzione degli ulteriori aggravamenti.

Gli assistiti esenti dalla partecipazione al costo ai sensi del presente regolamento e ai sensi del D.M. 28 maggio 1999, n.329, sono altresì esentati dalla partecipazione al costo delle prestazioni necessarie per l'inclusione nelle liste di attesa per trapianto.

Ferme restando le competenze della Commissione Unica del Farmaco, di cui all'art.7 del D.L.vo 30 giugno 1993, n.266, e successive modifiche, le regioni sulla base del fabbisogno della propria popolazione predispongono le modalità di



acquisizione e di distribuzione agli interessati dei farmaci specifici, anche mediante la fornitura diretta da parte dei servizi farmaceutici pubblici. [22]

La Commissione Europea tramite la Direzione Generale Salute e Tutela dei Consumatori, ha ritenuto necessaria una consultazione pubblica sull'ambito delle malattie rare, allo scopo di effettuare una sintesi degli elementi necessari per una politica efficace per affrontare l'importante questione delle malattie rare in Europa. Migliorare le possibilità dei pazienti di ricevere diagnosi, informazioni e assistenza corrette e tempestive è l'obiettivo strategico dell'intervento comunitario in questo campo, il cui raggiungimento contribuisce, a sua volta, al perseguimento dello scopo generale: migliorare la salute del cittadino e, quindi, aumentarne gli anni di vita in buona salute, indicatore chiave della Strategia di Lisbona.

A tal fine è necessario:

- rafforzare la collaborazione tra i programmi dell'Unione Europea: i programmi di sanità pubblica dell'UE, i Programmi Quadro per le attività di ricerca e sviluppo tecnologico, la strategia sui farmaci orfani, il regolamento relativo ai medicinali per uso pediatrico, la strategia sulle terapie avanzate, la futura direttiva sui Servizi Sanitari, il programma statistico dell'UE19 ed eventuali altre iniziative a livello dell'UE già in atto o future;
- incoraggiare l'UE27 ad elaborare politiche nazionali in materia di sanità che garantiscano ai pazienti affetti da malattie rare disponibilità e parità di accesso alla profilassi, alla diagnosi, alla terapia e alla riabilitazione. A tal fine, sono necessarie più iniziative di sensibilizzazione dell'opinione pubblica negli Stati membri. Oltre che all'opinione pubblica, sarebbe opportuno che tali sforzi fossero diretti anche agli Operatori Sanitari e dei Servizi Sociali, alle istituzioni

dotate di potere decisionale e ai quadri dirigenziali dei Servizi Sanitari e Sociali, nonché dei mezzi di comunicazione, e che si concretizzassero in particolare in una campagna annuale di sensibilizzazione;

- garantire lo sviluppo e la condivisione di linee guida comuni in ogni parte d'Europa: una serie di azioni specifiche in ambiti quali la ricerca, i centri di riferimento, l'accesso all'informazione, gli incentivi per lo sviluppo dei medicinali "orfani", lo *screening*, sarà parte di una strategia comune generale nel campo delle malattie rare.

Le domande poste durante la consultazione pubblica avevano un approccio integrato, dalla definizione di malattia rara alla necessità di creazione di un'agenzia europea sulle malattie rare, dal miglioramento all'accesso agli strumenti diagnostici di qualità, all'esigenza di un eventuale *screening* della popolazione per le malattie rare a livello dell'UE. [23]

## **FARMACI ORFANI.**

I cosiddetti "farmaci orfani" sono un vero problema per le persone affette da malattie rare: infatti, in condizioni di mercato normali, l'industria farmaceutica è poco propensa a investire in medicinali e apparecchiature destinate ai portatori di malattie rare a causa del ridottissimo mercato rappresentato dalle patologie rare. Ciò spiega perché le malattie rare siano anche definite "malattie orfane": esse, infatti, sono orfane di ricerca e di interesse da parte del mercato, nonché di politiche di sanità pubblica. [21]

In Europa è in atto il Regolamento CE n.141/2000 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 1999 concernente i medicinali orfani. Un medicinale è qualificato come medicinale orfano qualora il suo *sponsor* sia in grado di dimostrare:

- a) che esso è destinato alla diagnosi, alla profilassi o alla terapia di una affezione che comporta una minaccia per la vita o la debilitazione cronica e **che colpisce non più di cinque individui su diecimila nella Comunità, oppure** che esso è destinato alla diagnosi, alla profilassi o alla terapia nella Comunità di una affezione che comporta una minaccia per la vita, di un'affezione seriamente debilitante, o di un'affezione grave e cronica, e **che è poco probabile che, in mancanza di incentivi, la commercializzazione di tale medicinale all'interno della Comunità sia tanto redditizia da giustificare l'investimento necessario;**
- b) **che non esistono metodi soddisfacenti** di diagnosi, profilassi o terapia di tale affezione autorizzati nella Comunità oppure che, se tali metodi esistono, il medicinale in questione avrà effetti benefici significativi per le persone colpite da tale affezione.

#### **COMITATO PER I MEDICINALI ORFANI (COMP).**

Questo organo ha il compito di:

- esaminare le domande di assegnazione della qualifica di medicinale orfano ad un medicinale, presentate al Comitato in applicazione del presente Regolamento;
- consigliare la Commissione sull'istituzione e l'attuazione di una politica in materia di medicinali orfani per l'Unione Europea;
- assistere la Commissione nell'ambito delle discussioni internazionali su questioni relative ai medicinali orfani e nell'ambito delle relazioni con le associazioni che sostengono i pazienti;
- assistere la Commissione nell'elaborazione di linee direttrici dettagliate.

***Risultati di 5 anni di lavoro del COMP.***

- ✓ aprile 2000 – 2005: sono state presentate **458 domande** per l’assegnazione di qualifica di farmaco orfano;
- ✓ aprile 2005: più di **260** prodotti hanno ricevuto la qualifica di *farmaco orfano conditions*;
- ✓ **24** prodotti hanno ricevuto l’autorizzazione all’immissione in commercio

***Incentivi per i medicinali orfani.***

- Esclusività di mercato;
- assistenza per l'elaborazione di protocolli;
- altri incentivi: i medicinali qualificati come orfani possono beneficiare di incentivi messi a disposizione dalla Comunità e dagli Stati membri allo scopo di promuovere la ricerca, lo sviluppo e l'immissione in commercio dei medicinali orfani e in particolare delle misure di aiuto alla ricerca a favore delle piccole e medie imprese previste dai programmi quadro di ricerca e sviluppo tecnologico.

***Fondo per malattie rare e ricerca indipendente.***

Il 50% di questo Fondo è destinato al Fondo Nazionale per l’impiego di farmaci orfani per le malattie rare in attesa di commercializzazione, mentre il rimanente 50% è destinato alla promozione della ricerca indipendente ed altre attività dell’AIFA (programmi di farmacovigilanza, istituzione di un centro di informazione indipendente sul farmaco, programmi di comunicazione per un uso appropriato dei farmaci ed attività di formazione).

***New Deal della Salute - Programma del Governo del Ministro Livia Turco.***

- ☞ realizzazione di un programma nazionale triennale sulle malattie rare;
- ☞ istituzione di un fondo nazionale per le malattie rare, per la ricerca, lo sviluppo e l’accesso dei pazienti ai medicinali orfani;

- ☞ istituzione di un Comitato Nazionale per le malattie rare, presso il Ministero della Salute (rappresentanti delle Regioni, dei seguenti Ministeri: Salute, Pubblica Istruzione, Università e Ricerca, Politiche per la Famiglia, Solidarietà Sociale e dell'ISS e delle associazioni di tutela dei malati) con compiti consuntivi e propositivi sulla gestione del fondo;
- ☞ la disponibilità e gratuità di farmaci (classe C), di alimenti, di dispositivi medici e di altre sostanze attive utili per la cura sintomatica e di supporto esclusivamente dei soggetti portatori di malattie rare. [24]

## CONCLUSIONI

Dai dati raccolti per la stesura di questa tesi, abbiamo constatato che la sindrome di Guillain-Barrè, pur essendo annoverata tra le malattie rare (la percentuale di casi è ritenuta bassa, 2 casi/100.000 persone), colpisce comunque più di 120 mila persone ogni anno e 3 mila di esse muoiono. La percentuale di persone colpite appare più incisiva se si pensa alla severità con cui si manifesta questa malattia e alle terribili sofferenze a cui sono sottoposte le migliaia di persone che ogni anno la contraggono.

La lettura di diari di pazienti colpiti dalla Sindrome e l'aver capito che le difficoltà maggiori da superare, oltre alle sofferenze fisiche, sono le pesanti complicazioni psicologiche ha suscitato in noi una maggior consapevolezza su ciò che rappresenta questa patologia: un totale isolamento dal mondo esterno, dove il tempo sembra non trascorrere mai, e una concreta impossibilità di comunicare con altre persone, stanti le condizioni in cui si viene a trovare il soggetto colpito dalla totale paralisi del corpo (vengono infatti a mancare anche le semplici funzioni che diamo per scontate come la lacrimazione e la salivazione).

Il pericolo di vita in caso di GBS, sebbene non sottovalutabile, fortunatamente è diminuito nel corso degli anni grazie all'introduzione di nuovi protocolli di cure come la ventilazione assistita. L'introduzione di questa terapia ha segnato un'evoluzione fondamentale nella prognosi di GBS, in quanto ha portato un notevole aumento delle possibilità di sopravvivenza, fino al 25% circa. La terapia attraverso plasmateresi o tramite iniezione di immunoglobuline per via endovenosa, inoltre, ha portato alla diminuzione della percentuale di pazienti che necessitano di ventilazione assistita (dal 27% al 14%), risultando anche in un miglioramento della disabilità a 4 settimane dall'inizio del trattamento e la riduzione della disabilità residua oltre a riuscire a prevenire la morte.

Gli studi che hanno rivestito un'importanza maggiore sono sicuramente quelli collegati al *Campylobacter jejuni*. Basti pensare che il 50 % delle cause che determinano lo sviluppo della sindrome di Guillain-Barrè sono di derivazione batterica e virale e che il 76 % delle batteriche sono date appunto dal *Campylobacter jejuni*. E' quindi di notevole rilievo la scoperta che la patogenesi di tale sindrome è

data probabilmente dal mimetismo molecolare da parte dei lipooligosaccaridi del *Campylobacter jejuni*, soprattutto di quelli del sierotipo HS:19 e HS:41, responsabili diretti della malattia. Ciò è stato rilevato e confermato attraverso esperimenti *in vitro* e in ratti di Lewis affetti da EAN, una GBS indotta per studi di laboratorio. Siamo dell'avviso che questa possa essere la strada più giusta da seguire. Riteniamo infatti che, qualora si arrivasse a determinare tutti i sierotipi di *Campylobacter jejuni* che possono scatenare GBS, una volta diagnosticata una generica campilobatteriosi associata ad uno di questi sierotipi, si possa procedere a terapie preventive contro l'esordio dei fenomeni autoimmuni riuscendo, quindi, ad avere il controllo almeno sulla metà dei fattori scatenanti GBS. In questo modo si potrebbe avere una notevole riduzione del numero di persone colpite ed un conseguente risparmio di vite umane. Addirittura, pensando in maniera più globale si potrebbe gettare le basi per capire i meccanismi che intervengono in altre malattie autoimmuni.

Sulla base di queste rilevanti scoperte, riteniamo che sarebbe opportuno dare sempre più maggiore attenzione a questa sindrome che rende la persona colpita totalmente inerme.

Attualmente, nel WorldWideWeb, sistema di informazione maggiormente utilizzato per la ricerca di informazioni riguardanti la sindrome, data la mancanza di testi specifici, esistono numerosi siti che spiegano la GBS in modo generale e superficiale. Abbiamo riscontrato anche una notevole carenza di siti internet e la totale mancanza d'informazioni, in lingua italiana, che trattino questa malattia in modo approfondito ed esaustivo: dalla scoperta alle possibili cure, passando per la patogenesi, la comparsa dei sintomi e le associazioni di supporto.

Queste ultime appaiono come un generico elenco in qualche sito, mentre invece si dovrebbe provvedere alla realizzazione di un vero punto di riferimento completo di informazioni scientifiche sulla GBS ma, soprattutto, che possa essere fonte di consulenza per i pazienti, oltre ad offrire incontri con specialisti di questa patologia disponibili per visite mediche e capaci di fornire appropriate istruzioni ai familiari dei pazienti al fine di agevolare la comunicazione con il malato in modo tale da essere un vero sostegno, anche emotivo per il malato medesimo.

## **APPENDICE A**

### **IL SISTEMA IMMUNITARIO**

Il sistema immunitario dei vertebrati e quindi dell'uomo, si può definire come una straordinaria rete di cellule, tessuti, e molecole che mediano la resistenza alle malattie, soprattutto infettive, preservando l'integrità dell'organismo. La sequenza di reazioni che si verificano in seguito all'incontro dell'antigene con l'anticorpo è detta RISPOSTA IMMUNITARIA. Una caratteristica fondamentale del sistema immunitario è la capacità di distinguere tra le strutture endogene ed esogene che non costituiscono un pericolo (*self*) e quelle che si dimostrano nocive e quindi che devono essere eliminate (*non self*). La discriminazione tra *self* e *non self* avviene a livello molecolare ed è mediata da particolari strutture cellulari (recettori *Toll-like*, recettori dei linfociti T, complessi MHC, anticorpi), che consentono la presentazione ed il riconoscimento di componenti dell'agente lesivo definite antigeni (letteralmente induttori di anticorpi). [30]

### **IMMUNITÀ INNATA O ASPECIFICA**

I meccanismi di difesa dell'ospite comprendono l'immunità innata o naturale o aspecifica, che media un'iniziale protezione nei confronti delle infezioni, responsabili dell'infiammazione, questo tipo di difesa è sempre operativo nel soggetto sano e pronto a bloccare l'ingresso dei microbi nell'organismo o di eliminare quelli che siano riusciti ad entrare. Questo tipo di immunità è costituita sia da misure difensive di tipo fisico-chimico come le barriere epiteliali, le mucose, le secrezioni esocrine (saliva), che dai mediatori dell'infiammazione, sia da misure di tipo biologico, quindi dalle cellule specializzate e da sostanze naturalmente dotate di azione antibiotica, ma nel caso i microbi siano in grado di attraversare l'epitelio ed invadere tessuti e circolo generale vengono attaccate da fagociti e linfociti specializzati chiamati *Natural Killer* (NK), nonché da numerose proteine presenti nel plasma. L'immunità innata oltre ad essere il primo argine di difesa nei confronti delle infezioni, potenziano le risposte immunitarie acquisite e rimuovono strutture *self* danneggiate o consumate, ad esempio gli eritrociti. La caratteristica fondamentale dell'immunità aspecifica è la capacità di rispondere immediatamente ad un vasto numero di agenti patogeni grazie al riconoscimento di un limitato numero di profili molecolari *non-self* estremamente diffusi in natura (come LPS, glicani ricchi in mannosio, RNA a doppia elica, ecc.). La rapidità del riconoscimento e della risposta difensiva conseguente è dovuta al fatto che i meccanismi di riconoscimento sono presenti uniformemente su tutti i componenti dell'immunità aspecifica e sono completamente determinati a livello genetico senza alcun



bisogno di processi maturativi di tipo epigenetico (v. immunità specifica, pag. 164). La semplicità e la velocità che caratterizzano questo sistema sono però ottenute al prezzo di:

- un'efficienza non sempre ottimale nell'eliminazione di numerosi agenti patogeni (dotati ad es. di profili molecolari leggermente diversi da quelli contro i quali si è evoluta l'immunità aspecifica);
- l'incapacità di adattarsi alle contromisure sviluppate dai microrganismi patogeni (in tempi estremamente brevi grazie all'alta velocità e all'elevato numero di replicazioni di cui tali microrganismi sono capaci);
- una scarsa capacità di discriminazione tra *self* e *non-self*, che determina lo sviluppo di danni tissutali spesso sproporzionati rispetto all'entità dello stimolo immunogeno (infezione).

La mancanza di specificità è parzialmente compensata dalla funzione opsonizzante degli anticorpi, che possono contemporaneamente legare con alta specificità gli antigeni provenienti dagli agenti patogeni e con bassa specificità alcuni recettori espressi sulle cellule dell'immunità innata. [25]

## CELLULE DELL'IMMUNITÀ ASPECIFICA

La componente cellulare dell'immunità aspecifica comprende prevalentemente cellule di derivazione mieloide, ma anche alcuni stipti di tipo linfoide. Le principali cellule coinvolte nella sindrome di *Guillain-Barrè* sono:

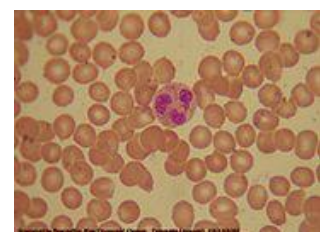
### Granulociti

I granulociti sono un tipo di globuli bianchi; sono così definiti poiché contengono delle granulazioni nel loro citoplasma dalle cui affinità tintoriali dipende la loro classificazione. Queste granulazioni assumono poco i coloranti acidi e basici nei neutrofili, mentre si colorano con coloranti acidi negli eosinofili e con quelli basici nei basofili.

Sono anche noti come leucociti nucleopolimorfi o polimorfonucleati (PML o PMN) per via della forma variabile del loro nucleo cellulare, che di solito è trilobato. La maggior parte dei granulociti presenti nel sangue sono neutrofili: in effetti, i termini "granulocita" e "neutrofilo" sono spesso usati in modo intercambiabile nella letteratura medica. I granulociti sono riscontrabili: nel midollo, come riserva che viene riversata in circolo al bisogno; nel sangue, come cellule circolanti; nei tessuti, dove migrano dal sangue per diapedesi, attirati da fattori chemiotattici rilasciati in caso di infezione. I granulociti una volta usciti dal circolo sanguigno non sono più in grado di rientrarvi, al contrario di quanto accade per i linfociti.

- GRANULOCITA NEUTROFILO

I granulociti neutrofili sono un tipo di granulociti, globuli bianchi il cui citoplasma contiene granulazioni



caratteristiche ed un nucleo lobato (per cui i granulociti vengono anche chiamati *polimorfonucleati*) ed hanno funzioni di difesa dell'organismo contro infezioni batteriche e fungine

- **GRANULOCITA BASOFILO**

Il granulocita basofilo rappresenta solo lo 0-1% dei globuli bianchi, ha un diametro di circa 10  $\mu\text{m}$ , un nucleo reniforme o bilobato, i suoi granuli sono basofili, come è evidenziato dal nome stesso. La funzione di questi granulociti è espletata nella genesi delle reazioni allergiche e di tutti i fenomeni di ipersensibilità, con meccanismi molto simili a quelli dei mastociti, come del resto si evince dalla composizione dei granuli e dalla presenza del recettore per le IgE.



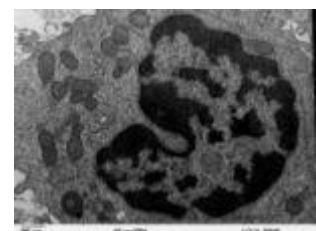
- **GRANULOCITA EOSINOFILO**

I granulociti eosinofili sono cellule del sistema immunitario così chiamate per il fatto che all'interno del citoplasma presentano delle granulazioni che si colorano con un colorante particolare chiamato eosina la quale li fa apparire di un colore rosato. Vengono prodotti dal midollo osseo e sono importanti nella risposta immunitaria soprattutto nei confronti dei parassiti. Nella loro membrana, hanno un recettore verso le IgE, che sono coinvolte nelle reazioni allergiche, in quanto i granuli specifici del citoplasma eosinofilo contengono istaminasi (enzima che idrolizza l'istamina, quindi ha un'azione antiinfiammatoria). [30]



### **Macrofagi e Cellule dendritiche**

I macrofagi (noti anche come istiociti) sono cellule mononucleate tissutali che appartengono al sistema dei fagociti. A questo sistema fanno pure parte i granulociti neutrofilo e i monociti. Essi svolgono un ruolo molto importante nelle risposte immunitarie naturali e specifiche. La loro funzione principale è la fagocitosi cioè la capacità di inglobare nel loro citoplasma particelle estranee, compresi i microrganismi, e di distruggerle. Secernono inoltre citochine ad attività proinfiammatoria e presentano l'antigene ai linfociti T-CD4. La cellula progenitrice dei macrofagi, come peraltro di tutte le altre cellule ematiche, è la cellula staminale multipotente. Nel midollo osseo questa cellula si differenzia in vari stadi cellulari tra cui quello che dà origine al monoblasto; maturando questa cellula lascia il midollo e si riversa nel torrente circolatorio sotto forma di monocita. I monociti in circolo sono circa 500-1000/ $\text{mm}^3$ , hanno un diametro di 10-15 micron, un nucleo reniforme o a fagiolo e un citoplasma finemente granulare contenente lisosomi, vacuoli fagocitici e filamenti di citoscheletro. Dal sangue migrano nei



tessuti e maturando si trasformano in macrofagi. Quindi i monociti e i macrofagi tissutali rappresentano due stadi di uno stesso tipo cellulare spesso denominato sistema dei fagociti mononucleati; questo sistema era indicato in passato con il termine ormai abbandonato di sistema reticolo-endoteliale. [26]

Nella sede di migrazione, caratterizzata dalla posizione strategica dalla quale captare gli agenti microbici, i macrofagi assumono caratteristiche citomorfologiche diverse a seconda del tessuto nel quale si sono localizzati:

- nel fegato rivestono i sinusoidi vascolari e prendono il nome di cellule di Kupffer;
- nel sistema nervoso centrale sono stati denominati cellule microgliali;
- nel polmone prendono il nome di macrofagi alveolari;
- nell'osso invece osteoclasti;
- a volte sviluppano un abbondante citoplasma e per la somiglianza con le cellule epiteliali cutanee sono state chiamate cellule epitelioidi;
- altre volte più macrofagi possono fondersi insieme per formare le cellule giganti multinucleate.

Oltre alla funzione di difesa esercitata con la fagocitosi di agenti estranei quali i microbi, i macrofagi svolgono un ruolo importante nel complesso meccanismo delle risposte immunitarie. A seconda del comparto del sistema immunitario nel quale si esplicano possono essere così riassunte:

nell'immunità innata:

- fagocitosi dei microbi e distruzione degli stessi;
- produzione di citochine capaci di richiamare e attivare altre cellule infiammatorie;
- secrezione di enzimi e di fattori di crescita, p.e. fattore di crescita piastrinico, che stimolano la crescita e l'attività dei fibroblasti e delle cellule endoteliali contribuendo così alla riparazione dei tessuti lesi dall'infezione;
- produzione, in corso di infezioni virali, di interferon-alfa, citochina capace di inibire la replicazione virale e il diffondersi dell'infezione ad altre cellule sane.

Nell'immunità specifica:

- presentazione dell'antigene ai linfociti T.

I macrofagi posseggono sulla loro superficie cellulare dei recettori di membrana con cui captano i microrganismi o altre particelle. In particolare ricordiamo tra tali recettori il CD14 che riconosce LPS (strato lipopolisaccaridico, struttura tipica dei batteri Gram-negativi), CD16 che riconosce l'Fc (parte terminale) delle IgG e vari recettori per i fattori del complemento. I recettori una volta attivati trasmettono dei segnali di rimodellamento della membrana cellulare che dapprima emette una estroflessione, quindi forma una rientranza sempre più profonda fino a quando le due estremità che avvolgono la particella non si toccano e si fondono fra loro. In questo modo il materiale estraneo si trova immerso nel

citoplasma del macrofago formando una vescicola rivestita di membrana detta fagosoma. In seguito alla inglobazione del microrganismo si attiva un processo per cui il fagosoma viene avvicinato ai lisosomi fino a fondersi con essi formando il fagolisosoma. Il materiale fagocitato viene così a contatto con vari enzimi contenuti nei lisosomi e quindi digerito. Tra questi enzimi ricordiamo:

- ossidasi fagocitica che converte l'ossigeno molecolare in prodotti intermedi reattivi dell'ossigeno che esplicano una azione tossica sui microrganismi. Una carenza genetica di tale enzima caratterizza la malattia granulomatoso cronica: in questa immunodeficienza i fagociti non riescono a eliminare i microbi e quindi l'organismo tenta di arginare l'infezione richiamando un numero sempre più grande di linfociti e macrofagi con formazione di granulomi;
- sintetasi inducibile dell'ossido nitrico che converte l'arginina in ossido nitrico dotato di attività microbica;
- proteasi lisosomiali che digeriscono le proteine batteriche, ad esempio: lisozima, proteine cationiche, defensine a ph acido e lattoferrine.

Bisogna comunque sottolineare che una reazione infiammatoria molto energica può portare alla liberazione di enzimi lisosomiali nello spazio extracellulare con danno ai tessuti dell'ospite stesso. Questo fenomeno accade in particolare ai macrofagi alveolari quando cercano di fagocitare fibre di amianto: la fagocitosi frustrata comporta la dannosa extravasazione del liquido lisosomiale nello spazio extracellulare causando un processo infiammatorio. Si ritiene che questo fenomeno possa essere alla base della cancerogenicità degli amianti. Per quanto riguarda invece i microrganismi in grado di sopravvivere alla fagocitosi ricordiamo le brucelle e i micobatteri.

Tra le funzioni effettrici dei macrofagi troviamo anche la capacità di lisare cellule opsonizzate da anticorpi o da fattori del complemento. Queste funzioni dei fagociti mononucleati sono possibili grazie alla presenza sulla membrana citoplasmatica di quest'ultimi di recettori specifici: CD16 che riconosce l'Fc (parte terminale) delle IgG e diversi recettori per le molecole del complemento. L'azione citotossica dei macrofagi sulle cellule infettate è molto diversa dalla fagocitosi, che sarebbe improponibile viste le dimensioni delle cellule da eliminare. Questa azione prevede infatti l'"iniezione" di organelli *killer* da parte del fagocita mononucleato verso la cellula bersaglio, la quale va incontro a lisi.

In seguito all'attivazione sollecitata dai microrganismi i macrofagi, come peraltro anche altre cellule del sistema immunitario, producono delle sostanze chiamate citochine: esse sono delle proteine che fanno da collegamento tra i diversi tipi di cellule coinvolte nell'infiammazione e nell'immunità. I microbi si legano tramite un componente

liposaccaridico detto LPS delle loro endotossine ad un recettore espresso sulla membrana dei macrofagi. Questo induce i macrofagi a secernere le seguenti citochine:

- *Fattore di necrosi tumorale (TNF)*: oltre che dai macrofagi è prodotto dai linfociti T, determina infiammazione attivando i neutrofili e le cellule endoteliali, nonché attivazione della coagulazione. Agisce inoltre sull'ipotalamo provocando febbre, sul fegato stimolando la sintesi delle proteine della fase acuta, sul muscolo e sul tessuto adiposo favorendo il catabolismo e nei casi estremi la cachessia. A concentrazioni elevate provoca vasodilatazione marcata e riduzione della contrattilità miocardica: con questo meccanismo si determinano ipotensione e formazione di trombi e nei casi più gravi shock.
- *Interleuchina 1 (IL-1)*: è prodotta anche dalle cellule endoteliali e possiede effetti molto simili al TNF.
- *Interleuchina 12 (IL-12)*: è prodotta anche dalle cellule dendritiche. Sui linfociti T e sui linfociti NK stimola la sintesi di interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) che amplifica la risposta degli stessi macrofagi. Sui linfociti T la differenziazione verso la linea Th1.
- *Interferon-alfa (IFN- $\alpha$ )*: è prodotto in caso di infezioni virali ed è capace di inibire la replicazione dei virus.

Affinché i linfociti T riconoscano gli antigeni e continuino la risposta immunitaria gli stessi devono essere loro presentati sotto forma di peptidi associati a molecole del Complesso maggiore di istocompatibilità (MHC). Le cellule che svolgono questo delicato compito sono chiamate cellule presentanti l'antigene (APC professionali). A questa famiglia di cellule appartengono i macrofagi e in genere i fagociti mononucleati, le cellule dendritiche, le cellule di Langerhans, i linfociti B.

Il processo di presentazione dell'antigene prevede una fase di processazione degli antigeni fagocitati durante la quale gli antigeni proteici vengono degradati per via enzimatica endocellulare e trasformati in peptidi. Successivamente i peptidi vengono espressi in superficie e inseriti in particolari tasche delle molecole MHC formando un unico complesso che viene esposto sulla superficie cellulare. In questo modo i linfociti T sono in grado di riconoscere gli antigeni estranei e di dare l'avvio al proseguimento della risposta immunitaria fornendo gli stimoli per la proliferazione e la differenziazione dei linfociti B e dei linfociti citotossici (CTL).

La presentazione degli antigeni ai linfociti T avviene nelle aree corticali dei linfonodi dove confluiscono trasportati dalle APC attraverso le vie linfatiche. Come era stato precedentemente esposto i macrofagi, come le altre cellule presentanti l'antigene, risiedono in forma inattiva in sedi strategiche che possono essere potenziali vie di ingresso degli agenti microbici, quali la cute, gli epiteli del sistema respiratorio e digerente, i sinusoidi del fegato. Una volta catturati e digeriti gli antigeni, queste cellule, attratte da chemochine, migrano per

via linfatica nei linfonodi drenanti; durante la migrazione esse vanno incontro a maturazione aumentando la sintesi di molecole MHC e di altre molecole dette costimolatori, in altri termini da cellule semplicemente capaci di captare l'antigene diventano ACP professionali cioè cellule capaci di presentare l'antigene ai linfociti T e di stimolare gli stessi a rispondere efficacemente.

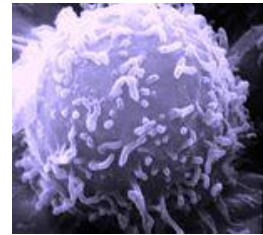
Le cellule dendritiche sono morfologicamente e funzionalmente specializzate nella cattura e nella presentazione di antigene (sono le classiche APC, *antigen presenting cells*). [26]

### **Cellula *Natural Killer* (NK)**

Le cellule *Natural Killer* o cellule NK sono cellule del sistema immunitario, particolarmente importanti nel riconoscimento e distruzione di cellule tumorali e infette da virus. Sono in grado inoltre di produrre citochine, come l'interferone gamma (che attiva i macrofagi). Un'altra denominazione è quella di linfociti grandi granulari a causa delle dimensioni maggiori rispetto ai linfociti B e T e per la presenza di granuli preformati nel citoplasma, contenenti i mediatori della loro citotossicità. Le NK non necessitano di attivazione, sono infatti indipendenti dal sistema immunitario specifico ed esplicano un'importante azione come prima difesa, tipica dell'immunità innata. Essendo le uniche in grado di riconoscere e combattere le cellule tumorali queste sono importante oggetto di studio nella ricerca contro il cancro. Sono le uniche cellule del sistema immunitario che non vengono prodotte durante la vita dell'organismo, si formano infatti durante la dodicesima settimana di sviluppo dell'embrione. Queste cellule sono le meno specializzate del sistema immunitario e distruggono ogni elemento cellulare riconosciuto come "*non-self*". Il riconoscimento avviene grazie a interazioni con il complesso maggiore di istocompatibilità. Per questo motivo sono causa di rigetto nei trapianti di organi riconosciuti come *non self*. Una alterazione nella capacità di riconoscere tali recettori rende le *Natural Killer* anche le principali responsabili di malattie autoimmuni. A differenza dei linfociti T citotossici le cellule NK riconoscono come *non-self* le cellule con bassa espressione di MHC-I come le cellule tumorali, inducendone la lisi; infatti le NK non trovando i giusti recettori self liberano intorno alla cellula estranea o modificata le perforine e i granzimi, le prime formano dei pori nella membrana plasmatica e i secondi, entrando attraverso questi pori, inducono la cascata caspatica e quindi la morte della cellula per apoptosi. Cellule con alta espressione di MHC-I sono resistenti alla citotossicità mediata dalle cellule NK perché queste ultime posseggono sulla loro superficie una famiglia di recettori inibitori (KIRs) che, ingaggiati nel legame con il complesso MHC-I mediano una cascata di segnali che prevengono il rilascio dei granuli citotossici. [27]

## Linfocita

I linfociti sono cellule presenti nel sangue che costituiscono tra il 20 e il 40% dei leucociti (secondo i dati delle formule leucocitarie riconosciute). Hanno la dimensione di 7-15  $\mu\text{m}$  (piccoli linfociti fino a 8  $\mu\text{m}$  e grandi linfociti da 9 in su), con un nucleo rotondeggiante, un citoplasma scarso (si riduce a un sottile anello) e pochi granuli. La cromatina risulta molto addensata e al microscopio elettronico è possibile distinguere un nucleolo (contrariamente a quanto si pensasse precedentemente). Svolgono un ruolo molto importante nel sistema immunitario: sono la struttura portante della nostra risposta immunitaria adattativa (ovvero specifica per un tipo di antigene). I Linfociti derivano dalla linea linfoide delle cellule staminali multipotenti presenti nel midollo osseo e a seconda del luogo, all'interno dell'organismo, nel quale avviene la maturazione cellulare, si ottengono due linee linfocitarie ben distinte: i *linfociti B* (da Bursa, con riferimento alla 'borsa di Fabrizio' scoperta da Girolamo Fabrici d'Acquapendente negli uccelli e dove si sviluppano i linfociti B) e i *linfociti T* (da Timo). Il luogo di maturazione dei linfociti risulta appunto diverso a seconda delle caratteristiche che questi hanno; il linfocita T infatti matura pienamente nel timo, mentre i linfociti B e NK (*Natural Killer*, i nostri linfociti "ancestrali") hanno piena maturazione nel midollo osseo, ovvero dove nascono. Nel differenziamento linfocitario si possono individuare principalmente due fasi: una fase antigene dipendente e una antigene indipendente. Nella fase antigene indipendente, che avviene negli organi linfoidi primari (midollo osseo e timo), vengono inizialmente prodotti linfociti provvisti di tutti i recettori per ogni tipo di antigene; successivamente alla fine di questo processo sono isolabili linfociti maturi che sono considerabili come "vergini" in quanto saprebbero riconoscere l'antigene ma non lo hanno mai incontrato direttamente. Nella fase antigene dipendente che si svolge negli organi linfoidi secondari (milza, linfonodi, ecc.) vi è l'incontro tra l'antigene e il linfocita che possiede il recettore adatto.



A questo punto si formano due categorie di cellule:

1. cellule della memoria, un pool di cellule capaci, in casi di rimaniestarsi dell'attacco patogeno, di velocizzare moltissimo (per scatenare una risposta linfocitaria adatta a contrastare un attacco patogeno sono necessari dai 3 ai 5 giorni circa) la risposta adattativa da affiancare alla risposta innata;
2. cellule effettrici, in grado esse stesse di combattere e distruggere il patogeno (esempio per i linfociti B le plasmacellule).

Tutte le cellule della linea leucocita derivano da un unico progenitore staminale multipotente riconoscibile dalla molecola CD34 (si dice CD34+). Successivamente viene creata una cellula staminale linfoide. Vi sono tuttavia delle patologie in cui questa maturazione non va a buon fine come per esempio le immunodeficienze combinate o Scid. I linfociti maturi sono

riconoscibili in quanto esprimono 5 famiglie di recettori: i recettori per l'antigene, i recettori MHC (complesso maggiore di istocompatibilità), recettori per fattori di crescita, recettori *homing* (consente al linfocita di essere indirizzato verso un organo linfoide secondario oppure verso un organo specifico in cui vi è proliferazione di patogeni) recettori di interazione cellula-cellula.

- **Linfociti B**

I linfociti B prendono il loro nome da un organo degli uccelli chiamato "Borsa di Fabrizio". Sono cellule che, in seguito a stimolazione, sono capaci di proliferare e trasformarsi in cellule effettrici, le plasmacellule, queste ultime capaci di liberare anticorpi. Gli anticorpi o immunoglobuline sono proteine specifiche che riescono ad identificare in maniera precisa e pressoché univoca specifici antigeni. Sono note 5 classi di Ig (dette M, A, G, D ed E). I linfociti "vergini" sono evidenziabili appunto grazie alla molecola IGM+. Una volta che l'agente patogeno viene circondato da anticorpi sensibili ad uno o più antigeni del patogeno stesso, viene attivato il sistema del complemento che provvede alla lisi del patogeno e richiama i macrofagi che "divorano" il patogeno. Il linfocita B può anche usare un sistema di opsonizzazione limitandosi a rendere il patogeno riconoscibile al macrofago oppure, in caso di presenza di tossine, può provvedere a neutralizzarle affinché sempre il macrofago (lo spazzino dell'organismo) possa poi distruggerle.

- **Linfociti T**

I linfociti T riescono a riconoscere un antigene solo se esso viene "presentato" sulla superficie di una cellula complessato con le proteine del Complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), e non quindi nella sua forma solubile. I linfociti T possiedono un sistema di recettori, TCR/CD3, tramite i quali riescono a riconoscere il peptide antigenico, presente in un complesso con le proteine dell'MHC. Inoltre i superantigeni possono anche attivare in modo piuttosto aspecifico una grande popolazione di cellule T legandosi direttamente alle molecole MHC espresse su queste cellule senza che sia necessario il processamento. Queste sostanze sono prodotte da vari microorganismi come ad esempio streptococchi e stafilococchi. I peptidi espressi sulla cellula assieme alle proteine dell'MHC non derivano solo da antigeni, ma anche dal metabolismo cellulare, dopo digestione nel proteosoma, e possono essere quindi anche "molecole self", vale a dire proprie dell'organismo stesso e non provenienti da organismi estranei. Nel caso in cui una cellula sia infettata da virus, il virus stesso ineluttabilmente induce la cellula a produrre delle proteine che servono alla proliferazione virale e alcune di queste proteine virali vengono lise dai proteosomi e presentate sulla cellula infetta provocando il marcamento per un linfocita di tipo T della cellula infettata. I linfociti T non hanno però solo una funzione effettrice capace



di eliminare cellule tumorali, infette e organismi patogeni, ma hanno anche una funzione regolatrice tramite la produzione di linfocine, molecole che sono alla base di fenomeni di cooperazione cellulare nella risposta immunitaria. Le cellule a funzione effettrice possiedono la molecola di riconoscimento CD8 (sono dette CD8+) e sono i linfociti T citotossici (CTL); le cellule con funzione regolatrice sono marcate dalla CD4 (dette CD4+) e sono i linfociti *T helper* (CTH). I linfociti T hanno una metodologia di differenziamento particolare che avviene nel timo. Nella zona capsulare di questo possiamo trovare i timociti, linfociti non ancora maturi, che esprimono sulla loro superficie la molecola CD7 e non quella caratterizzante la loro specie linfoide, la CD3. Un secondo stadio avviene nella zona corticale in cui i timociti sono immersi in maglie epiteliali che producono fattori di crescita aiutandone così la maturazione. Successivamente vi è un riarrangiamento del TCR/CD3 che è molto simile a quello delle immunoglobuline. In questo stadio il linfocita esprime sia CD4 (tipica del *T helper*) sia CD8 (tipica del linfocita effettrice). Da ricordare che le cellule CD8+ riconoscono le MHC del primo gruppo mentre i CD4+ quelle del secondo gruppo. Molto importanti per il sistema immunitario e linfoide sono le cellule dendritiche del sistema immune che permettono il corretto espletamento delle funzioni delle cellule di linea linfoide. Le cellule dendritiche sono capaci infatti non solo di captare proteine virali espulse dalla cellula per presentarle ai linfociti negli organi linfoidi secondari ma svolgono anche una funzione di smistamento nel timo corticale dei linfociti che potrebbero essere dannosi per l'organismo riconoscendo una cellula *self* come *non self* avendo un complesso TCR/CD3 mal funzionante. Un altro sistema di selezione sembra essere quello delle cellule *nurse* che una volta sembravano deputate a istruire i linfociti mentre oggi sembrano avere una funzione selettiva.[27]

- Linfociti NK

I linfociti NK (*Natural Killer*) sono un tipo molto curioso di linfociti e costituiscono il 20% della popolazione linfoide. Possiedono alta attività antitumorale e antivirale pur non essendo soggetti a espansione genica. Esso possiede due importanti recettori FC $\gamma$ R e NCR. Gli FC $\gamma$ R sono capaci di riconoscere un patogeno mentre gli NCR sono capaci di uccidere indiscriminatamente. Per evitare possibili complicazioni i NK sono stati dotati dall'evoluzione di KIR (*Killer Inhibitor Receptors*) in grado, riconoscendo le molecole HLA di primo tipo, di evitare la morte cellulare della cellula. Non tutti i linfociti NK sono dotati di complesso NCR/KIR. La molecola CD56 è invece presente su tutta questa famiglia linfoide. Queste molecole possono presentarsi nella forma *Dim* ovvero essere deputate alla venuta del linfocita NK nel sito infiammatorio e molecole *Bright* deputate al richiamo del linfocita nell'organo linfoide

secondario. Questi meccanismi di richiamo sono indotti da fattori chemiotattici come quelli della famiglia IL (esempio IL8, Interleuchina 8). [30]

Le cellule dell'immunità aspecifica sono dotate di una serie di recettori codificati in linea germinale, che consentono loro di interfacciarsi direttamente o indirettamente con gli antigeni o di riconoscere la presenza di uno stato infiammatorio e di innescare la risposta immune, e sono:

- **Recettori *Toll-like* (TLR):** recettori a singolo segmento transmembrana, espressi da numerose specie cellulari e funzionali al riconoscimento di *pattern* molecolari stereotipati;
- **Recettori per il frammento cristallizzabile (invariante) delle immunoglobuline (FcγR, FcεR):** potenziano la specificità e l'ampiezza del riconoscimento antigenico delle cellule dell'immunità innata, grazie al legame ad anticorpi opsonizzanti specifici. Ovviamente questo meccanismo non funziona come prima linea di difesa a meno che un soggetto non sia già stato esposto ad un antigene e sia quindi già dotato di immunoglobuline specifiche ;
- **Recettori per il complemento (CR):** rendono le cellule dell'immunità innata sensibili all'attivazione della cascata complementare;
- **Recettori delle cellule *natural-killer* (NK):** riconoscono molecole MHC di classe I attivando o inibendo (a seconda del tipo di recettore) la risposta citotossica delle NK. Appartengono a due grandi famiglie:
  - Recettori omologhi alle lectine di tipo C, costituenti il complesso del recettore NK (NKC)
  - Recettori con domini immunoglobulinici (KIR: *Killer cells Immunoglobulinic Receptors*)
- **Recettori delle cellule T di tipo  $\gamma\delta$ :** riconoscono ligandi caratteristici del tessuto in cui risiedono (epiteli), ma espressi solo in seguito ad un'infezione (es. *heat shock proteins*). A differenza dei TCR sono molto poco variabili;
- **Recettori delle cellule T NK:** si tratta di TCR formati da una catena invariante più una delle tre possibili catene  $\beta$ . Riconoscono antigeni glicolipidici. [25]

## IMMUNITA' ACQUISITA O SPECIFICA

L'immunità acquisita o adattativa o specifica, che si sviluppa più lentamente e che media una fase tardiva, e pertanto anche più efficace nella difesa contro gli agenti infettivi. E' un sistema di difesa che viene stimolato dai microbi che invadono i tessuti e pertanto acquisita dopo l'avvenuto contatto dell'organismo con i patogeni estranei. Comprende Linfociti e loro prodotti, come gli Anticorpi. I linfociti esprimono recettori che riconoscono

in maniera specifica i prodotti di differenti microbi, nonché molecole di natura non infettiva detti Antigeni. L'immunità specifica è costituita prevalentemente da cellule della linea linfoide (della serie T e B) e da cellule accessorie. I linfociti T si suddividono in linfociti T helper CD4+ e linfociti T citotossici (CTL) CD8+. La funzione effettrice dei primi è quella di coordinare il complesso della risposta immune attivando linfociti CD8+ e macrofagi (*T-helper 1*) o linfociti B (*T-helper 2*) e di sostenere il processo infiammatorio. Tale attività è svolta attraverso interazioni cellula-cellula o mediante rilascio di particolari fattori solubili detti citochine. La funzione effettrice dei linfociti CD8+ è quella di lisare le cellule infette grazie alla produzione delle linfochine. I linfociti B attivati si specializzano invece in cellule secernenti anticorpi (plasmacellule). [30] Le cellule accessorie sono le cellule reclutate dal compartimento innato del sistema immunitario. A differenza dell'immunità aspecifica o innata l'immunità specifica o acquisita è stata selezionata dall'evoluzione per la sua capacità di adattarsi dinamicamente alla variabilità di agenti ambientali riconosciuti come un pericolo per l'organismo. Tale variabilità è ovviamente una caratteristica peculiare di molti microrganismi infettivi in continua coevoluzione con il sistema immunitario che cerca di distruggerli. L'immunità specifica deve dunque essere in grado di rispondere a tutte le possibili combinazioni molecolari presenti in natura e in grado di interagire con l'organismo. Poiché si stima che il numero di queste combinazioni si aggiri intorno a  $10^{10}$ , l'immunità adattativa deve dotarsi di un numero altrettanto vasto di strutture cellulari capaci di legare specificatamente ad ogni singolo antigene. Dato che però il genoma umano comprende complessivamente solo 30.000 geni è impossibile che ciascuna struttura di presentazione e riconoscimento antigenico sia codificata da un singolo gene. Questo paradosso può essere risolto analizzando la composizione molecolare degli anticorpi, dei recettori dei linfociti T (TCR) e dei complessi MHC: si tratta infatti in tutti i casi di complessi proteici costituiti dalla combinazione di più strutture modulari codificate da molteplici (ma comunque numericamente limitate) varianti di geni dello stesso tipo. Ogni cellula del sistema immunitario adattativo nel corso della sua maturazione opera un riarrangiamento casuale del repertorio genetico ereditato dal soggetto in linea germinale generando una combinazione unica di MHC, TCR o anticorpi. Un ulteriore raffinato meccanismo di generazione della diversità del patrimonio anticorpale (inteso in senso lato come il complesso delle strutture deputate al riconoscimento dell'antigene) è dato dall'inserimento di piccole mutazioni puntiformi all'interno dei geni che codificano per i moduli delle strutture di riconoscimento antigenico. Quest'ultimo fenomeno è particolarmente accentuato nei linfociti B in fase di maturazione tardiva (ipermutazione somatica). Il riarrangiamento somatico delle strutture anticorpali è ovviamente un processo estremamente dispendioso, poiché determina la produzione di numerose varianti non funzionali. In altri termini ciascun individuo sviluppa autonomamente dal momento della nascita un sistema immunitario basato sui determinanti

genetici ereditati in linea germinale, ma dotato di caratteristiche uniche e irripetibili dovute alla casualità degli eventi di ricombinazione e alla pressione selettiva dell'ambiente esterno. L'adozione di una forma di riconoscimento antigenico non precostituita e in grado di evolversi con la storia biologica dell'individuo pone il sistema immunitario nella necessità di dotarsi di alcune funzioni particolarmente evolute normalmente proprie di sistemi superiori come il sistema nervoso centrale.

Il sistema immunitario deve mantenere **memoria** delle strutture di riconoscimento antigenico dimostratesi efficaci nel rispondere a precedenti aggressioni, che potrebbero ripresentarsi, ed inoltre deve poter essere "istruito" a riconoscere il self dal non self per rendere più efficace la risposta alle aggressioni e prevenire l'autoimmunità (sebbene alcune reazioni autoimmuni controllate siano parte della fisiologia della risposta immune stessa). I fenomeni di controllo dell'autoimmunità vengono definiti **tolleranza** e si svolgono negli organi linfoidi primari (tolleranza centrale) durante la maturazione delle cellule del sistema immunitario e in periferia al termine di questo processo (tolleranza periferica). La maturazione dell'immunità specifica si svolge prevalentemente durante il primo anno, anche se in realtà prosegue per tutta la vita dell'individuo.

L'istruzione dei linfociti T (prodotti a livello midollare) avviene nel timo (che si atrofizza in genere dopo l'infanzia) e consiste in un rigidissimo processo di selezione delle varianti cellulari in grado di montare un TCR completo in grado di legare con affinità intermedia (cioè attraverso un legame reversibile e temporaneo) complessi MHC-antigene (peptidico), corrispondenti a (quasi) tutto il patrimonio self dell'individuo. I complessi MHC-antigene self vengono presentati da particolari APC (*antigen presenting cells*), che nell'ambiente timico sono stimulate a esprimere i prodotti del gene AIRE (*autoimmune regulator*). Quest'ultimo funge da derepressore genico, consentendo l'espressione di numerose classi di geni, normalmente attivi soltanto in alcune linee cellulari specializzate (muscolo, cellule beta pancreatiche...) e quindi teoricamente non soggetti a tolleranza immunitaria. Tutte le cellule che montano varianti di TCR non funzionali o autoreattive vengono eliminate per assenza di stimoli di sopravvivenza o per eccesso di stimoli proapoptotici (in realtà una parte di cloni moderatamente autoreattivi sopravvive in funzione dell'ampliamento della copertura anticorpale dell'organismo). La selezione dei linfociti T è particolarmente rigida poiché comprende anche le specie CD4+, che sono responsabili del coordinamento dell'intera risposta immune.

L'istruzione dei linfociti B, è diversa, si sviluppano e maturano nel midollo osseo, dove attraverso opportuni riarrangiamenti sviluppano numerose varianti di recettori delle cellule B (BCR). Queste strutture costituiscono i precursori di membrana dei futuri anticorpi (che sono invece rilasciati in forma solubile dalle plasmacellule) e come questi ultimi (e a differenza dei TCR) riconoscono gli antigeni in forma nativa e non nel contesto di una struttura MHC. I

meccanismi di selezione dei linfociti B sono poco conosciuti, anche se è chiaro che si tratta di un processo estremamente meno rigido rispetto a quello dei linfociti T. Questo fenomeno si spiega con due ragioni:

- i linfociti B dipendono dalla stretta interazione con i linfociti T CD4+ per la loro attivazione e maturazione definitiva in plasmacellule. Quindi se un linfocita B è autoreattivo, ma non viene attivato da un linfocita T autoreattivo per lo stesso antigene, non può attivarsi e dare autoimmunità
- i linfociti B, non essendo limitati da MHC per il riconoscimento antigenico, possono riconoscere un numero molto più ampio di antigeni anche non peptidici. Quindi un'eliminazione rigida di tutti i cloni autoreattivi potrebbe limitare la risposta anticorpale in caso di aggressione.

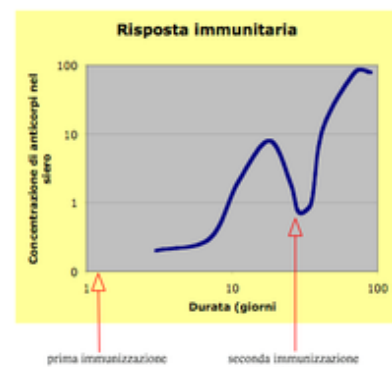
L'immunità specifica si divide a sua volta in:

- immunità specifica umorale, mediata da anticorpi. Nella difesa specifica umorale il ruolo fondamentale spetta agli anticorpi che sono prodotti dalle plasmacellule delle cellule derivate dalle cellule clone che a loro volta sono cellule derivate dai linfociti B. Il processo di difesa umorale inizia quando un linfocita rileva un agente esterno grazie al suo recettore specifico, ossia che rileva uno ed un solo corpo esterno, (ci sono vari gruppi di linfociti B che hanno diversi recettori) e inizia la produzione di cellule clone che in parte saranno destinate alla memoria immunologica e in parte andranno a formare le plasmacellule. Le plasmacellule poi produrranno gli anticorpi che si legheranno al corpo esterno bloccando i suoi siti attivi facilitando la fagocitosi da parte dei macrofagi.
- Immunità specifica cellulo-mediata. È svolta dai linfociti T, che distruggono un virus che ha già infettato una cellula. I linfociti T tramite recettori specifici si legano al complesso *self-non self* esposto dalle cellule APC in modo che possano creare dei fori nella parete cellulare mediante l'azione di un enzima da loro secreto, la perforina. Questo porta la cellula alla lisi.

## IMMUNIZZAZIONE

Esistono diversi tipi di immunità:

- *immunità congenita*: un individuo senza mai essere messo a contatto con un antigene, riesce ad opporsi
- *immunità naturale attiva*: quella che ci possiamo costruire solo vivendo
- *immunità naturale passiva*: è un tipo di immunità



che ci è data passivamente (es. il bambino che riceve gli anticorpi della madre tramite l'allattamento)

- *immunità artificiale attiva*: è l'immunità che ci procuriamo tramite i vaccini
- *immunità artificiale passiva*: consiste nella sieroterapia; questa però, oltre ad essere molto costosa, ha anche lo svantaggio di avere una durata limitata poiché gli anticorpi durano solo 10-15 giorni [30]

## Anticorpo

Un anticorpo (più propriamente immunoglobulina) è una proteina con una peculiare struttura quaternaria che le conferisce una forma a "Y". Gli anticorpi hanno la funzione, nell'ambito del sistema immunitario di neutralizzare corpi estranei come virus e batteri, riconoscendo ogni determinante antigenico legato al corpo come un bersaglio. In maniera schematica e semplificata si può dire che ciò avviene perché al termine dei bracci della "Y" vi è una struttura in grado di "chiudere" i segmenti del corpo da riconoscere. Ogni chiusura ha una chiave diversa, costituita dal proprio determinante antigenico; quando la "chiave" (l'antigene) è inserita, l'anticorpo si attiva. La produzione di anticorpi è la funzione principale del sistema immunitario umorale.

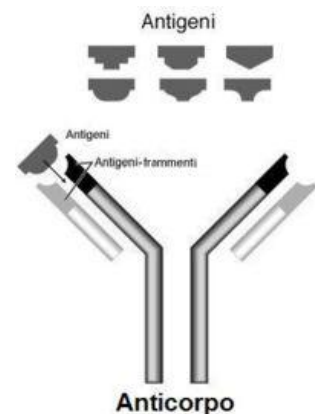
Gli anticorpi sono una classe di glicoproteine del siero, il cui ruolo nella risposta immunitaria specifica è di enorme importanza. Hanno la capacità di legarsi in maniera specifica agli antigeni (microorganismi infettivi come batteri, tossine, o qualunque macromolecola estranea che provochi la formazione di anticorpi). Vengono prodotte dai linfociti B degli organismi a sangue caldo. [30]

Gli anticorpi sono complessi proteici a struttura modulare capaci di legarsi in modo altamente specifico a particelle strutturalmente complementari denominate antigeni. La combinazione di più moduli garantisce la possibilità di generare un elevato numero di strutture diverse, capaci di coprire l'intero spettro antigenico virtualmente incontrabile dal sistema immunitario in natura. Dal punto di vista funzionale sono distinguibili due componenti fondamentali:

- una regione costante (C), che media l'interazione dell'anticorpo con il complemento o con cellule dell'immunità innata;
- una regione variabile (V), che contiene il sito di combinazione con l'antigene e che è quindi variabile a seconda della specificità dell'anticorpo per un dato antigene.

Tali componenti sono poi organizzate a livello strutturale in un complesso proteico di tipo tetramerico. Le immunoglobuline sono infatti costituite da quattro catene glicoproteiche:

- due catene pesanti H uguali fra di loro;



- due catene leggere L anch'esse uguali fra di loro;

Ogni catena è poi costituita da un dominio variabile ( $V_H$  per la catena pesante,  $V_L$  per la catena leggera) posto all'estremità aminoterminale e da uno (per la catena leggera) o più (3-4 per la catena pesante) domini costanti ( $C_L$  o  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ ,  $C_{H4}$ ) all'estremità carbossiterminale. Infine all'interno di ciascun dominio variabile, a livello del sito di legame con l'antigene, sono presenti 3 segmenti caratterizzati da una estrema variabilità di sequenza e struttura.

Tali segmenti, responsabili della specificità di legame con l'antigene, vengono definiti regioni ipervariabili e sono intervallati dalle cosiddette regioni cornice (framework regions). A livello strutturale le regioni ipervariabili si presentano come tre anse ravvicinate all'interno di una complessa intelaiatura di foglietti beta composta dalle regioni cornice.

Le catene pesanti definiscono l'isotipo anticorpale e vengono perciò suddivise in 5 classi strutturali denominate con le lettere greche gamma ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ), miu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) corrispondenti alle cinque principali classi funzionali di anticorpi (rispettivamente IgG, IgA, IgM, IgD e IgE). Esistono inoltre 2 tipi di catene leggere indicate con kappa ( $\kappa$ ) e lambda ( $\lambda$ ).

La caratteristica forma a Y degli anticorpi si deve alla presenza di ponti disolfuro, che legano (in numero variabile da 3 a 14 a seconda della classe di immunoglobuline) le varie catene in modo tale che le due catene pesanti tra loro affiancate costituiscano, con la loro porzione carbossiterminale, il tronco della Y. I bracci della Y sono invece ciascuno formato dall'appaiamento dell'estremità aminoterminale di una catena pesante con una catena leggera.

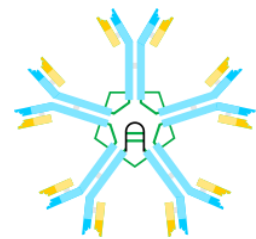
La digestione con pepsina scinde la molecola dell'immunoglobulina in due frammenti: uno costituito dai due bracci della Y chiamato frammento F(ab') (antigen binding) bivalente che contiene il sito combinatorio con l'antigene e un altro chiamato frammento Fc (frammento cristallizzabile, corrispondente ai domini  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  ed eventualmente  $C_{H4}$ ) che tende ad essere ulteriormente scisso in frammenti peptidici. Il frammento Fc è responsabile della maggior parte delle differenze funzionali tra i diversi isotipi.

Le immunoglobuline umane sono suddivise in 5 classi principali, elencate in ordine decrescente di concentrazione sierica: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Le catene leggere sono comuni alle cinque classi di immunoglobuline, che invece differiscono per le catene pesanti:  $\gamma$  per le IgG,  $\alpha$  per le IgA,  $\mu$  per le IgM,  $\delta$  per le IgD e  $\epsilon$  per le IgE.

- IgG: sono la classe di anticorpi maggiormente presenti nel siero, rappresentando circa il 75% delle immunoglobuline circolanti. Sono monomeri e hanno un peso molecolare di 150.000 u.m.a.. Attraversano la barriera placentare e quindi si trovano a concentrazione elevata già alla nascita, conferendo al neonato una certa protezione durante i primi mesi di vita. Si possono distinguere 4 sottoclassi: IgG1, IgG2, IgG3,

IgG4. Le sottoclassi 1 e 3 stimolano la reazione del complemento e intervengono nella risposta immunitaria secondaria.

- IgA: costituiscono circa il 20% delle immunoglobuline seriche (e ben il 60-70% delle totali) e sono presenti principalmente nelle secrezioni esterne, quali saliva, colostro, lacrime, muco delle vie respiratorie e del tubo digerente. Nel siero sono monomeri, nelle secrezioni possono formare dimeri e trimeri. Le IgA rappresentano un importante mezzo di difesa contro le infezioni locali; stimolano la reazione del complemento solo attraverso una via di attivazione alternativa e intervengono nella risposta immunitaria secondaria.
- IgM: costituiscono circa il 5-10% delle Ig totali. Nelle secrezioni formano dei pentameri, che compensano con l'elevata avidità la scarsa affinità di cui sono dotati i singoli monomeri. Le IgM infatti costituiscono la classe di anticorpi che per prima viene sintetizzata al contatto con un nuovo antigene e sono quindi parte della risposta immunitaria primaria. Stimolano la reazione del complemento e non passano la barriera placentare.
- IgD: rappresentano lo 0,2% delle immunoglobuline circolanti. Sono presenti sulla membrana cellulare dei linfociti B dove, legato l'antigene per cui sono specifiche, inducono l'attivazione della cellula a proliferare, maturare a plasmacellula e a produrre in forma solubile anticorpi in grado di riconoscere gli stessi antigeni della Ig di membrana.
- IgE: sono presenti nel siero in concentrazione bassissima, e sono monomeri. Sono responsabili della risposta ai parassiti. Il frammento Fc delle IgE si lega ai recettori di membrana dei mastociti e dei granulociti basofili; qui le IgE, dopo combinazione con gli antigeni corrispondenti, inducono la liberazione da parte delle stesse cellule dei mediatori responsabili delle reazioni allergiche di I tipo.



In seguito all'incontro con un antigene estraneo, l'organismo reagisce con la produzione di anticorpi specifici per quell'antigene e con l'instaurazione della memoria immunologica. L'antigene infatti stimola un particolare clone di linfociti B a proliferare e a differenziarsi in plasmacellule con la susseguente secrezione di anticorpi (risposta primaria). Una successiva introduzione dello stesso antigene agirà su un sistema immunologico già predisposto e quindi la risposta anticorpale sarà più pronta e più energica (risposta secondaria). La risposta primaria è bifasica: inizialmente vengono prodotti anticorpi di classe IgM e successivamente quelli di classe IgG. La risposta secondaria è invece di tipo IgG.

Il cambio di produzione di classe immunoglobulinica (*switch* isotipico), da IgM a IgG o altre classi, è sotto il controllo dei linfociti T ed è regolato da linfocine: l'interleuchina 4 stimola lo switch verso le IgE mentre l'interleuchina 5 verso le IgA.



## **PATOLOGIE DEL SISTEMA IMMUNITARIO**

Alterazioni della funzionalità del sistema immunitario portano allo sviluppo di tre classi di malattie:

- *Immunodeficienze*: sono patologie causate dalla mancanza o dall'inefficienza congenita (es. SCID, *severe combined immunodeficiency*) o acquisita per via infettiva (es. AIDS) o farmacologica (es. ciclosporina nei trapianti d'organo) di una o più branche del sistema immunitario. Le immunodeficienze si caratterizzano per l'aumentata suscettibilità a infezioni (anche di tipo opportunistico) e ad alcune patologie neoplastiche.
- *Malattie immuno-mediate*: in questo caso il sistema immunitario è strutturalmente normale, ma la sua funzionalità è alterata al punto da compromettere, invece che difendere, l'integrità dell'organismo. E' possibile che parte delle anomalie funzionali siano dovute ad uno "sbilanciamento" dell'attività del sistema immunitario verso una determinata linea cellulare non adeguatamente controllata nella sua maturazione e nello svolgimento delle sue funzioni effettrici. Tra le malattie immuno-mediate è possibile distinguere:
  - *Reazioni di ipersensibilità e Allergie*: si tratta di patologie che si sviluppano in seguito ad un'abnorme attività del sistema immunitario in risposta ad antigeni innocui (definiti allergeni). La forma più comune (allergia in senso stretto o reazione d'ipersensibilità di tipo 1) è mediata da IgE e si associa all'attivazione dei mastociti.
  - *Malattie Autoimmuni*: patologie in cui il sistema immunitario si attiva nei confronti del *self* distruggendolo. Una certa quota di autoimmunità è presente fisiologicamente ed è probabilmente indispensabile per il corretto svolgimento delle funzioni di difesa, mentre in questo caso l'attività *anti-self* è quantitativamente più significativa e soprattutto non è limitata temporalmente al contesto della normale risposta immune ad agenti patogeni. Esempi di malattie autoimmuni sono il lupus eritematoso sistemico, l'artrite reumatoide, la spondilite anchilosante, la sclerosi multipla, il diabete mellito di tipo 1.
- *Neoplasie del sistema immunitario*. Gli intensi fenomeni replicativi che caratterizzano le cellule del sistema immunitario per tutta l'esistenza dell'individuo, rendono conto della frequenza relativamente elevata con cui si sviluppano neoplasie a carico della linea linfoide o mieloide. [30]

## **INFIAMMAZIONE**

L'infiammazione o flogosi è un meccanismo di difesa non specifico innato, che costituisce una risposta protettiva, seguente all'azione dannosa di agenti fisici, chimici e biologici, il cui obiettivo finale è l'eliminazione della causa iniziale di danno cellulare o tissutale. L'infiammazione consiste in una sequenza dinamica di fenomeni che si manifestano con una intensa reazione vascolare. Questi fenomeni presentano caratteristiche relativamente costanti, nonostante l'infinita varietà di agenti lesivi, in quanto non sono determinati soltanto dall'agente lesivo, quanto soprattutto dalla liberazione di sostanze endogene: i mediatori chimici della flogosi. I fenomeni elementari, che costituiscono la risposta infiammatoria, comprendono: vasodilatazione e aumento di permeabilità, che portano al passaggio di liquidi dal letto vascolare al tessuto lesa (edema), e infiltrazione leucocitaria nell'area di lesione. L'infiammazione serve, dunque, a distruggere, diluire e confinare l'agente lesivo, ma allo stesso tempo mette in moto una serie di meccanismi che favoriscono la riparazione o la sostituzione del tessuto danneggiato.

Clinicamente, i segni cardinali dell'infiammazione sono: arrossamento, tumefazione, calore, dolore, alterazione funzionale. Sono manifestazione delle modificazioni tissutali che consistono in: vasodilatazione, aumento permeabilità capillari, stasi circolatoria e infiltrazione leucocitaria (con marginazione, rotolamento e adesione sulla superficie endoteliale di leucociti attraverso l'espressione di molecole di adesione, fase finale di diapedesi attraverso l'endotelio, chemiotassi per risposta dei leucociti presenti nello spazio interstiziale agli agenti chemiotattici, i quali li indirizzano verso la sede del danno). L'infiammazione viene classificata secondo un criterio temporale in infiammazione acuta e infiammazione cronica. Quest'ultima può poi essere distinta secondo un criterio spaziale in diffusa (infiammazione cronica interstiziale) oppure circoscritta (infiammazione cronica granulomatosa). [28]

### **INFIAMMAZIONE ACUTA**

L'infiammazione acuta è una risposta immediata e precoce a uno stimolo lesivo. È una reazione vascolare e cellulare al danno tissutale. Si caratterizza per:

- modificazioni vascolari;
- passaggio dei leucociti dal letto capillare al tessuto lesa;
- migrazione dei leucociti all'interno del tessuto soggetto al processo flogistico.

Queste fasi portano alla formazione di un essudato, fluido ricco di sostanze proteiche e cellule, con la finalità di contrastare, nell'area lesa, l'agente lesivo.

Segni cardinali di infiammazione acuta:

- rubor: arrossamento dovuto all'aumento di sangue nell'area;
- tumor: rigonfiamento dovuto all'edema;

- calor: aumento della temperatura in seguito all'iperemia e ad un aumento del metabolismo cellulare;
- dolor: dolore per alterazioni biochimiche locali;
- functio laesa: inibizione della funzionalità dell'area colpita (specie se si tratta di un'articolazione) a causa del dolore e degli squilibri indotti dai meccanismi facilitatori dell'infiammazione (es. edema) sull'integrità delle strutture infiammate.

#### Fasi principali dell'infiammazione acuta:

##### **1. Vasocostrizione (fase iniziale)**

Transitoria, incostante, dura pochi secondi fino a qualche minuto (non sempre presente). Interessa arteriole pre-capillari nelle immediate vicinanze della zona colpita. Dipende dalla liberazione di sostanze vasocostrittrici di tipo catecolaminico (adrenalina, noradrenalina, serotonina).

##### **2. Vasodilatazione o iperemia attiva**

Inizia con il rilascio degli sfinteri arteriolari ed è successivamente sostenuta dall'apertura di nuovi letti capillari e dalla chiusura degli shunt arterovenosi fisiologicamente attivi a riposo. La vasodilatazione aumenta la quantità di sangue che rifornisce il tessuto lesso (iperemia) ed è potenziata dall'aumento della permeabilità vascolare associato (vedi sotto). L'innesco ed il mantenimento della vasodilatazione sono dovuti al rilascio di mediatori rapidi come l'istamina o le prostaglandine e successivamente di mediatori lenti come IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , LPS, PAF. Questi ultimi stimolano l'espressione della sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNos) a livello del muscolo liscio vascolare. Al contrario l'istamina attraverso un aumento delle concentrazioni di calcio intracellulare determina l'attivazione (rapida) della NO sintasi costitutiva. Entrambe le isoforme di quest'ultimo enzima sono poi responsabili della sintesi di monossido di azoto (NO), un potentissimo vasodilatatore, che agisce sul muscolo liscio vascolare provocandone il rilassamento attraverso la mediazione di una guanilato ciclasi NO-dipendente. Quest'ultima genera guanosina monofosfato ciclica (cGMP), che a sua volta regola la funzione di numerosi enzimi e componenti cellulari coinvolti nella contrazione del muscolo liscio vascolare:

- inibisce la chinasi della catena leggera della miosina (MLCK);
- inibisce i recettori rianodici (RYR);
- attiva la proteina chinasi G (PKG), che a sua volta provoca un'attivazione della fosfatasi della catena leggera della miosina (MLCP : enzima antagonista di MLCK) e diminuisce le concentrazioni di calcio intracellulare (fondamentale per la contrazione del muscolo liscio);
- attiva la PGH-sintasi 1 e 2 favorendo il mantenimento dello stato infiammatorio e in ultima analisi della vasodilatazione.

Effetti della vasodilatazione. L'aumento del calibro vascolare provoca:

- riduzione della velocità del flusso sanguigno (stasi): questa condizione favorisce il rolling leucocitario, rallenta l'eventuale diffusione di patogeni e favorisce l'adesione del complemento ai patogeni;
- aumento della pressione trasmurale con conseguente aumento della trasudazione vascolare e quindi del drenaggio linfatico (vedi Equazione di Starling).

L'aumento del drenaggio linfatico favorisce la presentazione antigenica. [28]

### **3. Aumento della Permeabilità vascolare**

Altro segno distintivo dell'Infiammazione acuta è l'aumento della Permeabilità vascolare a livello del microcircolo nell'area di lesione, dando luogo alla fuoriuscita di essudato, attraverso 5 meccanismi:

- danno diretto da agente patogeno => endotelio distrutto e membrana basale lassa; è una risposta immediata e mantenuta a lungo in tutti i tipi di vasi, fino a riparazione del danno.;
- danno da istamina => contrazione delle cellule endoteliali + disgiunzione delle unioni intercellulari; è immediata e transitoria per azione degli stessi mediatori che favoriscono la VD arteriolare, oltre a sostanze propriamente patogene, come l'endotossina, che stimola i fattori complemento (es: C5a), che a loro volta stimolano l'aumento della permeabilità, rinforzando la risposta flogistica;
- lesione da leucociti (anche detta capillare tardiva) => per diapedesi, durante la transepitelizzazione dei leucociti, e la secrezione di ulteriori mediatori cellulari e proteolitici; la risposta è tardiva e prolungata.

Inoltre, essendo principalmente a carico della componente capillare, il protrarsi del processo infiammatorio altera il normale equilibrio di scambi gassosi e idrici tra interstizio e microcircolo tale da produrre, insieme ad elementi di cui sopra e altri, la classica istolesività associata alla flogosi;

- transitosi (o citopempsi) aumentata => aumento della mobilità delle caveole transmembranarie, via preferenziale del plasma, favorendo il passo di materiale idrosolubile attraverso la MB;
- neoangiogenesi => formazione di nuovi abbozzi vascolari durante la riparazione tissutale, delicati e facilmente emorragici fino alla formazione di nuove unioni intercellulari.

L'essudato è una miscela di liquidi plasmatici ricchi di proteine plasmatiche e/o cellule (per lo più infiammatori, come neutrofili e mononucleati, ma anche eritrociti), fuoriuscita dai vasi, per l'aumento della permeabilità capillare e iperemia attiva, ai tessuti o alle cavità sierose). Questo provoca edema infiammatorio. L'aumento della permeabilità è contemporaneo alla vasodilatazione che porta ad un aumento della massa di sangue presente

e la pressione che esso esercita sulle pareti con aumento della permeabilità. L'aumento della pressione idrostatica e aumento della pressione colloidale-osmotica determinano:

1. dilatazione delle arteriole (aumento del flusso di liquidi verso l'esterno),
2. apertura del letto capillare,
3. dilatazione venulare che porta ad un aumento del flusso di liquidi verso l'esterno.

#### **4. Migrazione dei leucociti nella sede d'infiammazione**

Una funzione fondamentale dell'infiammazione è quella di permettere ai leucociti di giungere nella sede del danno e lì inglobano agenti lesivi, uccidono batteri, degradano il tessuto necrotico e gli agenti estranei. Questo processo richiede l'attraversamento dell'endotelio vascolare delle venule post-capillari, che avviene in 4 fasi:

1. marginazione: un maggior numero di leucociti si posiziona lungo la parete del vaso (poiché il flusso rallenta);
2. rotolamento: i leucociti prima singolarmente poi in file intere, rotolano lungo l'endotelio aderendovi transitoriamente. L'endotelio viene poi rivestito tramite un processo detto di pavimentazione;
3. adesione: i leucociti rotolano fino a quando non aderiscono saldamente all'endotelio;
4. diapedesi: i leucociti inseriscono i loro pseudopodi nelle giunzioni tra le cellule endoteliali (oltrepassano anche la membrana basale);
5. chemiotassi: i leucociti si dirigono verso spazi extracellulari, attirati da sostanze chemiotattiche (esogene ed endogene) e una volta giunti nel sito di lesione, svolgono la loro funzione. [28]

Rotolamento, adesione e diapedesi sono regolate dalle molecole di adesione, suddivise in 4 famiglie:

- selectine,
- glicoproteine mucina-simile,
- immunoglobuline,
- integrine.

I leucociti (neutrofili, basofili, eosinofili, monociti) seguono tutti le stesse modalità di migrazione, i neutrofili, però, avendo vita più breve, vanno incontro ad apoptosi e scompaiono in 24-48h. I monociti si trasformano in macrofagi e hanno vita più lunga. Eccezioni: infezioni da *Pseudomonas spp.*, infezioni virali, reazioni allergiche. I leucociti hanno diverse funzioni:

1. fagocitosi
  1. riconoscimento e adesione: i microrganismi sono riconosciuti se rivestiti da fattori (opsonine) che si legano a specifici recettori leucocitari (aumenta molto l'efficienza della fagocitosi);

2. ingestione: dalla cellula si formano estensioni citoplasmatiche (pseudopodi) che avvolgono l'agente estraneo (fagosoma) e successivamente si forma il fagolisosoma;
3. uccisione: O<sub>2</sub>-dipendente e O<sub>2</sub>-indipendente;
4. degradazione: dopo l'uccisione le idrolasi acide dei granuli dei leucociti degradano il batterio, il Ph scende a valori di 4, ottimale per l'attivazione di questi enzimi.

2. Produzione di metaboliti dell'acido arachidonico;
3. degranulazione e secrezione di enzimi lisosomiali;
4. produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS);
5. modulazione di molecole di adesione del leucocitaria.

### 5. Fase di rallentamento del circolo o iperemia passiva

Dopo la fuoriuscita di liquidi (essudazione) e di cellule (diapedesi) aumenta la viscosità del sangue, mentre diminuisce la velocità del flusso (stasi): nella zona infiammata i letti vascolari accolgono (come nelle fasi iniziali) più sangue della norma (iperemia), ma ciò è dovuto al rallentamento del circolo e al diminuito ritorno venoso (iperemia passiva) e non all'apertura di nuovi letti capillari (iperemia attiva). Le cause del diminuito ritorno venoso risiedono la compressione esercitata sulle venule da parte del edematoso, che ostacola così il passaggio di sangue provocando una riduzione della sua parte liquida ed un aumento relativo delle componenti solide.

### 6. Risposte di fase acuta

Se l'infiammazione è particolarmente intensa o interessa un'area molto estesa di tessuto possono instaurarsi le cosiddette risposte di fase acuta, che comprendono:

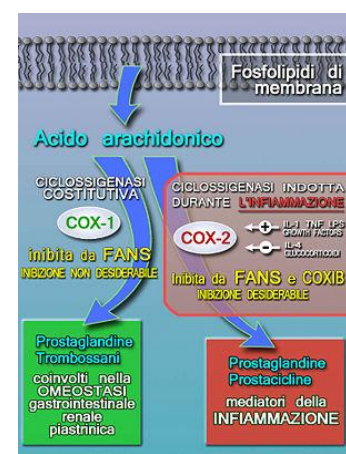
- febbre;
- sintesi epatica delle proteine di fase acuta (es. PCR: proteina C reattiva);
- alterazioni metaboliche (es. cachessia).

### 7. Fenomeni produttivi e riparatori

Si tratta di processi stimolati dai mediatori infiammatori che portano alla completa *restitutio ad integrum* del tessuto danneggiato qualora quest'ultimo sia capace di rigenerarsi o alla deposizione di una cicatrice di fibrina e tessuto connettivo qualora il danno sia a carico di un tessuto nobile. In tutti i casi si osservano fenomeni di neoangiogenesi.

### Mediatori chimici dell'infiammazione acuta

Durante il processo infiammatorio vengono prodotti importanti mediatori chimici di origine plasmatica e cellulare, questi hanno un recettore specifico e un mediatore può



stimolare il rilascio di altri mediatori da parte di cellule bersaglio con effetto di amplificazione o effetto di modulazione o regolazione. I mediatori possono agire su uno o su più tipi cellulari e possono esercitare effetti diversi a seconda del tipo di tessuto o cellula; quando vengono prodotti o rilasciati hanno un'emivita breve.

- *Mediatori di origine plasmatica*: sono prodotti dal fegato, che li mette in circolo, sono in forma inattiva e vengono attivati quando serve, dall'attivazione del fattore XII (importante nel sistema delle chinine e in quello della coagulazione/fibrinolisi) e dall'attivazione del complemento (fattori che attivati interagiscono in successione in un sistema a cascata).
- *Mediatori di origine cellulare*: si suddividono in 2 sottogruppi:
  - Mediatori preformati, presenti in granuli di secrezione: istamina (mastociti, basofili, piastrine), serotonina (piastrine), enzimi lisosomiali (neutrofili, macrofagi). L'istamina causa nella fase immediata dilatazione delle arteriole, aumento della permeabilità delle venule. [28]
  - Mediatori sintetizzati ex novo, al bisogno:
    - prostaglandine (tutti i leucociti, piastrine, [endotelio], derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico, che tramite l'enzima ciclo-ossigenasi si trasforma in prostaglandina, che a sua volta, tramite PGH2 dà vita a prostaciclina (vasodilata e inibisce l'aggregazione piastrinica), trombossano (vasocostringe e promuove aggregazione piastrinica) e PGD2, PGE2, PGF2 $\alpha$ , PGI2. Queste ultime sostanze sostengono la vasodilatazione potenziando l'edema. Inoltre PGE2 e PGF2 $\alpha$  agiscono sulle fibre nervose polimodali di tipo C (in genere in risposta a bradichinina) abbassandone la soglia di scarica e determinando così i sintomi dolorosi associati all'infiammazione. Infine PGE2 secreta dall'endotelio dei vasi ipotalamici in risposta ad alte concentrazioni di TNF, IL-1 e IL-6 agisce sul nucleo termoregolatore ipotalamico causando la febbre. Aspirina e farmaci non steroidei inibiscono la ciclo-ossigenasi bloccando la sintesi di prostaglandine.
    - Leucotrieni (tutti i leucociti), derivano dal metabolismo dell'acido arachidonico e danno vasocostrizione, broncospasmo, aumento della permeabilità, chemiotassi.
    - Fattori attivanti le piastrine -PAF- (leucociti, endotelio): fonti: mastociti, neutrofili, endotelio, piastrine, monociti/macrofagi; azioni pro-infiammatorie: aumento della permeabilità vascolare, vasodilatazione, aggregazione leucocitaria, chemiotassi, attivazione piastrinica. È molto più potente dell'istamina.

- Specie reattive dell'ossigeno (leucociti): i radicali liberi dell'O<sub>2</sub> vengono rilasciati dai leucociti nell'ambiente extracellulare in seguito ad esposizione ad agenti chemiotattici, immunocomplessi o durante la fagocitosi. Il loro rilascio può causare danni all'ospite.
- Ossido di azoto-NO- (macrofagi): gas solubile prodotto dalle cellule endoteliali, macrofagi, neuroni. Ha emivita breve e azione locale; nei vasi provoca vasodilatazione. Le specie reattive che derivano dalla NO sintetasi possiedono attività antimicrobiche.
- Citochine (linfociti, macrofagi, endotelio): proteine prodotte da diversi tipi cellulari che modulano la funzione delle altre cellule, sono coinvolte nell'immunità e nell'infiammazione. Avremo: monochine (prodotte da fagociti mononucleati), linfocine (da linfociti attivati), interleuchine (da cellule ematopoietiche), chemiocine (condividono la capacità di stimolare la motilità e il movimento orientato dei leucociti, specie nell'infiammazione.

Prodotti batterici, immunocomplessi, tossine, agenti fisici e altre citochine, attivano macrofagi e altre cellule determinando: reazioni della fase acuta (febbre, sonno, neutrofilia, aumento delle proteine, diminuzione dell'appetito...), effetti sull'endotelio, sui fibroblasti e sui leucociti.

### **INFIAMMAZIONE CRONICA**

L'infiammazione cronica è un processo flogistico di lunga durata in cui coesistono l'infiammazione attiva, la distruzione tissutale e i tentativi di riparazione. Le infiammazioni croniche possono derivare da una persistenza degli antigeni flogogeni in seguito ad un'infiammazione acuta non completamente risolta; è possibile che tali agenti non siano raggiungibili da parte dei sistemi di difesa, oppure che le sostanze litiche non siano in grado di digerirli. L'indice di cronicità dell'infiammazione è dato dalla quantità di tessuto di granulazione che è stato formato dai fibroblasti e dal livello della linfocitosi sviluppatasi.

È tuttavia più frequente che un'infiammazione cronica nasca già cronica: questo genere di reazione vede una prevalenza dei fenomeni cellulari (richiamo chemiotattico di cellule infiammatorie) su quelli vascolari (iperemia), che sono talvolta assenti. I granulociti neutrofili sono sempre meno coinvolti man mano che la cronicizzazione è più spiccata, mentre il tessuto di granulazione, l'angiogenesi e l'accumulo degli altri leucociti caratterizzano anche le infiammazioni croniche.

#### Eziologia:

- infezioni persistenti (ad es. tubercolosi, sifilide...);
- esposizione prolungata ad agenti tossici (silicosi, cirrosi, aterosclerosi...);
- reazioni autoimmuni e di ipersensibilità.

#### Caratteristiche patogenetiche:



- infiltrazione di cellule mononucleate macrofagi, linfociti, plasmacellule;
- distruzione o necrosi tissutale, indotta soprattutto dalle cellule infiammatorie;
- tentativi di riparazione del tessuto danneggiato: angiogenesi e fibrosi (deposizione di connettivo).

Il macrofago è il protagonista principale dell'infiammazione cronica e la sua attivazione può avvenire in maniera:

- immunitaria: il linfocita T attivato agisce sul monocita macrofago che attiva il macrofago;
- non immunitaria: endotossine, fibronectina e altri mediatori agiscono sul monocita-macrofago.

I prodotti rilasciati dai macrofagi attivati sono:

- enzimi: proteasi neutre (elastasi, collagenasi..) e idrolisi acide (lipasi acida, fosfatasi acida);
- proteine plasmatiche: componenti del complemento e fattori della coagulazione;
- specie reattive dell'O<sub>2</sub>: radicale ossidrilico, perossido di idrogeno;
- metaboliti dell'acido arachidonico: leucotrieni, prostaglandine;
- fattori di crescita;
- citochina;
- ossido nitrico (porta a fibrosi e danno tissutale).

Durante l'infiammazione cronica i macrofagi si accumulano per un reclutamento continuo di monociti dal circolo, per proliferazione locale dei macrofagi residenti e per loro immobilizzazione nel tessuto infiammato, dovuta al potente richiamo chemiotattico.

Altre cellule caratteristiche dell'infiammazione cronica:

- linfociti B (plasmacellule) che producono anticorpi diretti contro antigeni presenti nella sede dell'infiammazione, o contro componenti tissutali modificati;
- linfociti T;
- mastociti;
- eosinofili. [28]

## **APPENDICE B**

### **IL SISTEMA NERVOSO**

Il **sistema nervoso** é un'unità morfo-funzionale caratterizzata da un tessuto altamente specializzato nell'elaborazione di segnali bioelettrici. Nei Vertebrati, una caratteristica fondamentale del *sistema nervoso* sta nella sua duplice collocazione anatomica: distinguiamo un nevrasse, allocato all'interno di un rivestimento costituito da tre strati fibro-vascolari (meningi) situato all'interno del cranio e del canale vertebrale, e un sistema extranevrassiale che comprende tutte le strutture che decorrono all'esterno dello scheletro osseo. La presenza del rivestimento meningeo fa distinguere due grandi spazi bio-umoralì in cui il Sistema Nervoso è immerso: il liquor cerebrospinale e lo spazio extravascolare. Inoltre il sistema nervoso ha il compito di coordinare le diverse funzioni dei nostri organi. Le cellule nervose sono dotate di sensibilità che permette di ricevere, riconoscere e trasmettere tutti gli stimoli fisici e chimici provenienti dall'esterno e dall'interno del nostro organismo. L'interfaccia che viene a costituirsi tra i due ambienti è detta barriera ematoliquorale. [31]

### **GLI ELEMENTI CELLULARI DEL SISTEMA NERVOSO**

Il sistema nervoso è composto da tre elementi fondamentali:

1. la cellula nervosa (neuroni) composta da un soma, detto anche corpo cellulare, e dai suoi prolungamenti (assone o neurite e i dendriti).
2. nel nevrasse la glia, ovvero tutte le cellule non nervose, che distinguiamo in astrociti, oligodendrociti e ependimoglia e nel nervo periferico la cellula di Schwann.
3. il tessuto connettivo fibroso e i vasi venosi e arteriosi.

### **IL NEURONE**

I neuroni sono unità anatomiche e funzionali indipendenti, con complesse caratteristiche morfologiche. Essi sono responsabili della ricezione, della trasmissione e dell'elaborazione degli stimoli; dello scatenamento di alcune attività cellulari; e della liberazione di neurotrasmettitori e di altre molecole connesse con la trasmissione delle informazioni.

I neuroni sono costituiti da tre parti:

- a. *Soma o Pericarion*, il quale rappresenta il centro trofico dell'intera cellula nervosa. E' quella parte del neurone che contiene il nucleo e il citoplasma circostante, con l'esclusione dei prolungamenti cellulari, riceve un gran numero di terminazioni nervose che trasportano stimoli eccitatori o inibitori generati in altre cellule nervose. Il soma

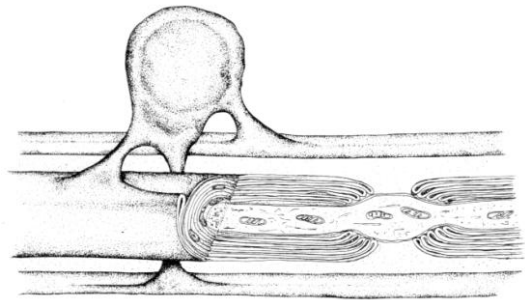
contiene un reticolo citoplasmatico rugoso molto sviluppato, organizzato in aggregati di cisterne parallele. Nel citoplasma compreso fra le cisterne vi è anche un gran numero di poliribosomi liberi. Queste cellule sintetizzano sia proteine strutturali che proteine destinate ad essere trasportate nei prolungamenti cellulari. Impiegando colorazioni appropriate (coloranti basici di asinina), il reticolo endoplasmatico rugoso e i ribosomi liberi appaiono, al microscopio ottico, come aree basofile granulari, denominate zolle o sostanza tigroide di Nissl. Il numero delle zolle di Nissl varia a seconda del tipo di neurone e dello stato funzionale. Esse sono particolarmente numerose nei neuroni di grandi dimensioni, in particolare nei neuroni motori. Il complesso di Golgi è localizzato soltanto nel soma e consiste di schiere multiple di cisterne parallele disposte attorno alla periferia del nucleo. I mitocondri sono particolarmente abbondanti nei terminali assonici; sono diffuso nel citoplasma del soma. Nel *Pericarion* e nei prolungamenti cellulari si trovano numerosi filamenti intermedi, i neurofilamenti. Per l'azione di certi fissativi i neurofilamenti si agglutinano, e se colorati con Sali d'argento formano le neurofibrille.

- b. *Dentriti*: prolungamenti lunghi e numerosi, specializzati nel ricevere stimoli dall'ambiente, dalle cellule epiteliali sensoriali o da altri neuroni, e si suddividono alla stessa guisa delle diramazioni di un'albero. Essi aumentano notevolmente l'area ricettiva della cellula; ciò consente al neurone di ricevere ed integrare un gran numero di terminali assonici di altre cellule nervose. Strutturalmente i dentriti sono molto simili al soma; sono però privi del complesso di Golgi. Le zolle di Nissl e i mitocondri sono sempre presenti, eccetto che nei dendriti più sottili. Di norma, appaiono ricoperti da un gran numero di piccole spine o gemme, cioè di piccoli processi al cui livello si stabiliscono i contatti sinaptici.
- c. *Assone*: è un prolungamento singolo specializzato nel generare o propagare impulsi nervosi ad altre cellule (nervose, muscolari e ghiandolari). La lunghezza e il diametro variano a seconda del tipo di neurone, per esempio gli assoni dei motoneuroni del midollo spinale che innervano i muscoli del piede possono raggiungere la lunghezza di circa 100 cm. Tutti gli assoni originano da una breve protrusione piramidale, il cono di emergenza o il monticolo massonico, il quale solitamente emerge dal soma. La membrana plastica dell'assone, chiamata assolemma ne delimita i contenuti noti col termine di assoplasma. Nei neuroni che danno origine a un assone mielinizzato, la parte dell'assone compresa fra il cono di emergenza e il punto in cui inizia la mielinizzazione è chiamata segmento iniziale. Nel segmento iniziale sono localizzati molti canali ionici, che hanno ruolo importante nel generare la modificazione del potenziale elettrico, che costituisce il potenziale d'azione. A differenza dei dentriti, gli assoni hanno un diametro costante e non si ramificano troppo profusamente. Talvolta

l'assone, poco dopo aver lasciato il corpo cellulare, da origine a diramazioni che ritornano verso il soma o che si portano ad altri neuroni, e queste diramazioni vengono dette rami collaterali. L'assenza di poliribosomi e di reticolo endoplasmatico rugoso e di reticolo endoplasmatico rugoso indica che la sopravvivenza dell'assone dipende dal pericarion. [31]

## LE CELLULE GLIALI

Giocano un'importante ruolo di sostegno, non generano potenziale d'azione, non contraggono sinapsi con altre cellule e al contrario dei neuroni conservano la capacità di dividersi per tutta la vita dell'organismo.



**Oligodendrociti:** producono le guaine mieliniche, le quali determinano l'isolamento elettrico dei neuroni del sistema nervoso centrale.

**Astrociti:** sono cellule conformate a stella perché irradiano dal corpo cellulare multipli processi. Queste cellule sono munite di fasci di filamenti intermedi costituiti dalla proteina fibrillare acida gliare, la quale rinforza la loro struttura. Questi pongono in connessione i neuroni con i capillari sanguigni e con la pia madre, una sottile lamina di tessuto connettivo che riveste il sistema nervoso centrale.

Gli Astrociti dotati di un numero ristretto di lunghi processi vengono denominati astrociti fibrosi e sono localizzati nella sostanza bianca; gli astrociti protoplasmatici, muniti di numerosi ma brevi processi ramificati, si rinvengono nella sostanza grigia.

In aggiunta alle loro funzioni strutturali, gli astrociti prendono parte al controllo dell'ambiente ionico e chimico dei neuroni. Un tipo di astrocito sviluppa processi con delle estremità terminale ampliate (pedicelli) che si connettono con le cellule endoteliali mediante complessi giunzionali. Si ritiene che attraverso pedicelli terminali gli astrociti trasferiscano molecole e ioni dal sangue ai neuroni; inoltre quando il sistema nervoso venga danneggiato, gli astrociti proliferano per produrre un tessuto cellulare cicatriziale.

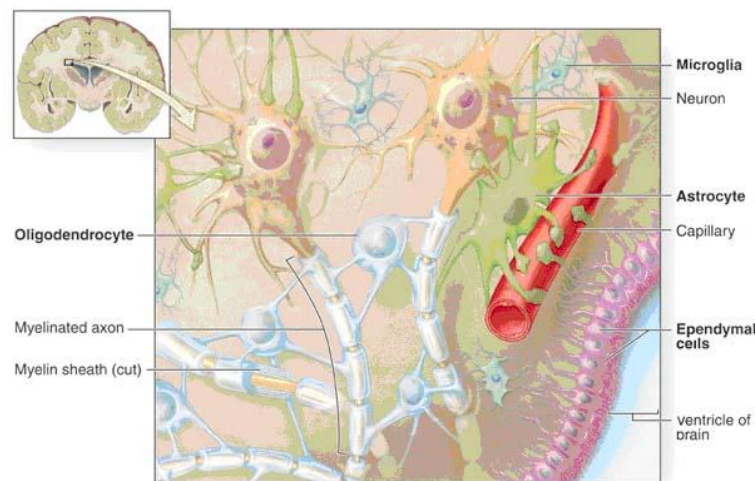
Gli astrociti possono influire sulla sopravvivenza e sulle attività dei neuroni grazie alla loro capacità di regolare gli elementi costitutivi dell'ambiente extracellulare, di assorbire l'eccesso locale di neurotrasmettitori, e di liberare molecole prodotte dal metabolismo o neuroattive. Gli astrociti sono in diretta comunicazione l'uno con l'altro per il tramite delle *gap junction*, formando in tal guisa una rete attraverso la quale la informazioni possono fluire da un punto all'altro, raggiungendo aree distanti.

**Microglia:** le cellule microgliali sono delle piccole cellule allungate munite di corti processi irregolari. Sono cellule fagocitarie e rappresentano il sistema dei fagociti mononucleati nell'ambito del tessuto nervoso, e derivano da precursori cellulari situati

nel midollo osseo. Esse sono coinvolte nei processi infiammatori e riparativi del sistema nervoso centrale dell'adulto e producono e rilasciano proteasi neutre e radicali dell'ossigeno. Quando vengono attivate le cellule microgliali retraggono i loro processi ed assumono le caratteristiche morfologiche dei macrofagi, diventando capaci di fagocitosi ed agendo come cellule che presentano gli antigeni. Le cellule microgliali secernono un certo numero di citochine immunoregolatorie ed eliminano i residui cellulari indesiderati prodotti da lesioni del sistema nervoso centrale. [31]

**Ependimoglia:** derivano dal rivestimento interno del tubo neurale e conservano il loro ordinamento di tipo epiteliale. La maggior parte delle cellule epiteliali possiedono ciglia mobili che servono ad impartire movimenti al liquido cerebrospinale. Le cellule ependimali posseggono numerosi mitocondri, un complesso di Golgi apicale e un reticolo endoplasmatico rugoso diffuso. La maggior parte di queste cellule ha una base d'appoggio pianeggiante, ma alcune sono dotate da lunghi prolungamenti che penetrano profondamente nel tessuto neurale sottostante. Recenti ricerche suggeriscono che tali cellule siano le cellule staminali del sistema nervoso centrale.

**Cellule di Schwann:** Svolgono la medesima funzione degli oligodendrociti, ma sono localizzate attorno agli assoni del sistema nervoso periferico. Una cellula di Schwann forma una guaina mielinica attorno ad un singolo assone, a differenza della capacità degli oligodendrociti di diramarsi e contattare fino a 20 processi di neuroni diversi.



La distinzione tra sistema nervoso centrale e periferico fa riferimento alla provenienza dei prolungamenti della cellule nervose ed al fatto che il rivestimento dei prolungamenti (assoni e/o dendriti) sia costituito dagli oligodendrociti (mielina centrale piuttosto che dalle cellule di Schwann (mielina periferica)).

Microscopicamente distinguiamo i seguenti organi del Sistema Nervoso:

- **centrale**
  - encefalo
    - telencefalo
    - diencefalo
    - cervelletto
    - tronco encefalico
  - midollo spinale
- **periferico**
  - radici spinali
  - plessi, gangli prevertebrali, gangli paravertebrali
  - tronchi nervosi o nervi propriamente detti, con i loro rami terminali e collaterali.

Il sistema nervoso compie tre principali funzioni: sensoriale, integrativa (che include: pensiero, memoria, ecc.) e motoria. In senso lato possiamo attribuirgli un ruolo "computazionale" di informazioni che viaggiano sotto forma di perturbazioni del potenziale di membrana delle cellule e che vengono elaborati nell'ambito di complessi sistemi di accoppiamento tra evento elettrico ed eventi biochimici entro dei compartimenti specifici dello spazio intercellulare che chiamiamo sinapsi. [31]

#### ***L'impulso nervoso.***

I neuroni sono cellule in grado di generare e condurre impulsi nervosi. Quando sono a riposo, e quindi non sono stimolati, presentano una differenza di potenziale elettrico tra la superficie interna ed esterna della membrana citoplasmatica, equivalente a -70 mV circa, essendo il versante interno più negativo di quello esterno per il prevalere delle cariche anioniche indiffusibili che si trovano concentrate all'interno della cellula stessa. Questa differenza è chiamata potenziale di riposo o di membrana. Nel momento in cui il neurone viene eccitato, lo stato delle cose si modifica bruscamente: la negatività interna viene sostituita da una modesta positività, circa 10-40 mV, seguita da un rapido ritorno alle condizioni precedenti, è il potenziale d'azione che dura in genere 0.5-2 msec in una cellula nervosa. In condizioni di quiescenza, il  $K^+$  è circa 30 volte più concentrato dentro la cellula, mentre il  $Na^+$  e il  $Cl^-$  lo sono maggiormente all'esterno rispettivamente di 10 e 14 volte, differenze imputabili all'attività della pompa  $Na^+ / K^+$ . La pompa, infatti, espelle contro gradiente di concentrazione ed elettrico, il  $Na^+$  penetrato nella cellula in condizioni di riposo e recuperando il  $K^+$  dentro la cellula stessa sempre contro gradiente chimico, con un rapporto di efficienza di 3  $Na^+$  estrusi per 2  $K^+$  recuperati. E' chiaro che ciò avviene con dispendio di energia, che viene fornita dall'idrolisi dell'ATP ad opera di una Adenosintrifosfatasi  $Na^+/K^+$

attivata. Si deve ricordare che in condizioni di riposo, la membrana cellulare è scarsamente permeabile ai  $\text{Na}^+$  mentre è modicamente permeabile ai  $\text{K}^+$ . Nello spessore della membrana esistono canali delimitati da particolari proteine che si lasciano attraversare da una specie ionica piuttosto che un'altra, tramite l'apertura di ipotetici cancelli che si possono aprire o chiudere in rapporto a differenze di potenziale o in presenza di determinate sostanze chimiche. Il potenziale a riposo trova dunque spiegazione nell'asimmetrica distribuzione degli ioni a cavallo della membrana citoplasmatica ed in particolare deve essere considerato come un potenziale di diffusione del  $\text{K}^+$  che, in virtù di un gradiente di concentrazione, tende ad uscire dalla cellula; movimento controbilanciato dalle cariche positive allineate sul versante esterno della membrana della cellula, ma soprattutto dall'elettronegatività creata dalle cariche anioniche intracellulari che sono impossibilitate a seguire il flusso del  $\text{K}^+$  verso l'esterno; quindi il Potenziale a Riposo non è dovuto alla pompa del  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , quest'ultima contribuisce solo a creare le condizioni per cui esso si instaura.

La capacità dei neuroni di creare impulsi una volta stimolati, dipende dall'ingresso tumultuoso del  $\text{Na}^+$  che, in virtù del favorevole gradiente elettrochimico, penetrano attraverso la membrana. Infatti gli impulsi nervosi sono rapidi cambiamenti di voltaggio a cavallo della membrana del neurone. Quando si un impulso nervoso in una qualsiasi parte della membrana, i canali del  $\text{Na}^+$  si aprono per 0.5 msec permettendo una breve immissione di  $\text{Na}^+$ , con conseguente azzeramento della negatività intracellulare, e un'inversione di segno, per un breve periodo la faccia interna della membrana diventa positiva di circa 20 mV (da +10 a +40 mV). Questo fenomeno nel suo insieme è detto depolarizzazione. In un secondo momento si chiudono i canali del  $\text{Na}^+$ , e si aprono per circa un msec, quelli del  $\text{K}^+$ . La diffusione di quest'ultimo ione all'esterno della cellula riporta la differenza di potenziale ai suoi valori iniziali di potenziale a riposo, ossia -70 mV, si ha quindi la ripolarizzazione della cellula. Il fenomeno inverso della depolarizzazione è l'iperpolarizzazione, che consiste in cambiamenti di voltaggio che rendono l'interno della cellula più negativo della norma, aumentando così il valore assoluto del potenziale di membrana, ad esempio da 70 mV a 80 mV. Quando si parla di neurone depolarizzato si sottolinea che esso è stato eccitato, mentre per iperpolarizzato si intende un neurone temporaneamente ineccitabile.

Per capire come si propaga l'impulso, è utile definire il concetto di soglia e periodo refrattario.

Per soglia o potenziale soglia si intende il decremento critico del livello di potenziale di membrana necessario per scatenare l'impulso. Si ritiene che un decremento al di sotto del valore minimo del potenziale di membrana non apra o apra solo in parte i canali del  $\text{Na}^+$  e la quantità di ioni non sia sufficiente a generare un potenziale d'azione. Il potenziale soglia equivale ad una depolarizzazione compresa tra i 10 e i 15 mV rispetto al potenziale di riposo.

Il periodo refrattario viene distinto in assoluto e relativo. Il periodo refrattario assoluto è il momento durante il quale avviene il potenziale d'azione ed il neurone non risponde ad altri stimoli, equivale quindi alla durata del potenziale d'azione. Nel periodo refrattario relativo, che fa seguito al potenziale d'azione, l'eccitabilità comincia a ripristinarsi ed un secondo evento depolarizzante può verificarsi applicando uno stimolo più intenso di quello normalmente necessario.

La propagazione dell'impulso nervoso lungo la membrana del neurone avviene come un'onda da una parte all'altra del punto in cui è in atto il potenziale d'azione; non può, invece, ritornare a questo punto in quanto esso si trova nel periodo refrattario assoluto. [29]

### ***Studi della conduzione nervosa.***

Attraverso la stimolazione dei nervi periferici con elettrodi collocati sulla cute e la registrazione dei potenziali d'azione del muscolo e del nervo sensitivo, è possibile esaminare la velocità di conduzione, le latenze distali, e le ampiezze delle risposte, le quali offrono importanti informazioni circa la funzione del nervo periferico. Questi studi possono essere di aiuto nello stabilire se i nervi periferici siano stati colpiti e se sì, aiutare nel determinare il processo patologico implicato (demyelinizzazione *vs* lesione assonale). Per questi studi, elettrodi di superficie sono posti sulla cute per la stimolazione dei nervi periferici accessibili, e il risultante potenziale d'azione composto è registrato in altra sede sopra il nervo o sopra il muscolo che innervato dal nervo oggetto di studio in quel momento. Due sedi di stimolazione sono usualmente utilizzate cosicché la velocità di conduzione può essere rilevata, dividendo la distanza tra i due punti di stimolazione per la differenza tra i tempi di conduzione. Queste velocità di conduzione dell'intero nervo misurano le proprietà degli assoni più larghi che conducono più velocemente all'interno del nervo ed hanno dei valori normali maggiori di 40 m/sec negli adulti. Una diminuzione delle velocità di conduzione è osservata nelle neuropatie periferiche caratterizzate da demielinizzazione, come la sindrome di *Guillain-Barré* e la malattia di *Charcot-Marie-Tooth*. Le misurazioni dell'ampiezza, sia del potenziale di azione muscolari evocati dalla stimolazione degli assoni motori o del potenziale d'azione del nervo sensitivo, possono offrire un'utile informazione. La riduzione di ampiezza è pronunciata specialmente in affezioni caratterizzate da perdite degli assoni (neuropatie uremiche e alcol-nutrizionali). La presenza, l'assenza o la riduzione di innervazione può essere determinata dalla stimolazione elettrica dei nervi periferici, e può essere dimostrata la localizzazione di un blocco di conduzione del nervo. Anomalie dell'innervazione possono essere identificate osservando quali muscoli rispondono alla stimolazione nervosa, e notando un'abnormale affaticamento dopo una stimolazione ripetuta. In presenza di paralisi, una risposta normale dei muscoli innervati alla stimolazione del nervo periferico mostra che la causa della paralisi è prossimale al punto di stimolazione.



D'altra parte, un'assenza o una risposta debole suggerisce la necessità di ulteriori analisi al fine di identificare il luogo e la natura del difetto.

***Riflesso H e onde F.***

Gli studi della conduzione nervosa offrono informazioni circa lo stato dei segmenti distali dei nervi periferici negli arti ma non danno informazioni sulla conduzione nervosa all'interno delle parti prossimali del nervo o delle radici spinali. Il riflesso H e l'onda F sono legati alla conduzione attraverso le radici spinali e le parti prossimali del nervo periferico e pertanto offrono importanti informazioni diagnostiche circa le affezioni che coinvolgono queste aree. Per evocare il riflesso H, stimoli sottomassimali sono applicati ai nervi misti (sensitivo-motori) ad una intensità troppo bassa per produrre una risposta motoria diretta. Questi stimoli evocano una contrazione muscolare (onda H) con una latenza relativamente lunga a causa dell'attivazione delle fibre afferenti I dei fusi muscolari che si dirigono attraverso le vie dorsali verso la sostanza grigia spinale dove contraggono sinapsi con i neuroni motori inferiori i cui potenziali d'azione quindi transitano attraverso le radici ventrali e infine ai muscoli. L'assenza dei riflessi H suggerisce la presenza di condizioni patologiche lungo queste vie ed è spesso il risultato di radicolopatie, affezioni che coinvolgono i nervi periferici, o polineuropatie che coinvolgono radici spinali o porzioni prossimali dei nervi periferici (GBS). L'onda-F è una risposta a lunga latenza, che segue il potenziale muscolare diretto, ed è evocata da una stimolazione sovramassimale dei nervi sensitivo-motori. Essa è prodotta da una stimolazione antidromica (retrograda) degli assoni motori, che determina l'invasione dei potenziali d'azione nei corpi cellulari posti nel midollo spinale e ne evoca un secondo potenziale d'azione (di rimbalzo) che viaggia lungo gli assoni motori verso il muscolo. Come con il riflesso H, l'assenza delle onde F implica la presenza di condizioni patologiche delle radici spinali o di tratti prossimali dei nervi periferici. [30]

## **ALLEGATO**

### **FONDAZIONI E ASSOCIAZIONI CHE SI OCCUPANO DELLA SINDROME DI GUILLAIN BARRÉ.**

Nonostante approfondite ricerche in internet e richieste inviate per e-mail, non si sono raccolte molte informazioni in merito a Fondazioni e/o Associazioni che si occupano della sindrome di Guillain Barré.

A livello internazionale la *GBS/CIDP Foundation International* appare come l'unica istituzione sufficientemente organizzata per quanto riguarda la GBS.

La fondazione fornisce servizi e assistenza per i malati di GBS, informazioni per medici specialisti. Venne fondata nel 1980 da Robert ed Estelle Benson allo scopo di aiutare le persone ad affrontare questa malattia gravemente debilitante, in cui la guarigione è incerta. La Fondazione GBS/CIDP ha oltre 160 succursali in USA, Canada, Europa, Australia, Sudafrica e Nuova Zelanda. L'obiettivo dell'organizzazione è quello di fornire supporto ai pazienti affetti da GBS ed ai familiari dei colpiti. E' gestita da figure altamente qualificate: infatti, vanta di poter contare fra i componenti del Comitato Consultivo Medico alcuni dei principali esperti mondiali di GBS, oltre a medici che hanno sofferto a loro volta di questa malattia.

I servizi che offre la fondazione sono i seguenti:

- visite presso i pazienti da parte di persone precedentemente affette da GBS;
- materiale informativo molto esauriente intitolato "GBS: una descrizione generale per il " personale non medico";
- scheda descrittiva sulla GBS/CIDP;
- supporto dei pazienti da parte di sezioni locali dell'organizzazione;
- elenco delle succursali dell'organizzazione in tutto il mondo;
- nominativi di medici che hanno esperienza nel trattamento della GBS;
- attiva ricerca di finanziamenti per la ricerca;
- simposi formativi internazionali per il personale sanitario e il pubblico.

In Italia non esiste una Associazione specifica per questa patologia.

E' presente invece una Fondazione di riferimento per questa malattia: la GBSFI - Fondazione Internazionale Sindrome di Guillain-Barré, presente in Campania, Associazione di pazienti.

In Europa risultano invece presenti numerose Associazioni di pazienti che forniscono supporto ai colpiti dalla Sindrome di Guillain-Barré:

- BELGIO
  - Arrondissement Brussel Hoofdstad – BRUXELLES
    - Groupe de soutien au personnes atteintes du syndrome de Guillain-Barré
  - Oost-Vlaanderen – AALST
    - GIBAS vzw - Diagnosegroep Guillain-Barré en CIDP vzw
- GERMANIA
  - Baden-Württemberg – FREIBURG
    - DGM - Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V.
  - Baden-Württemberg - SINSHEIM-HILSBACH
    - Bundesverband Deutsche GBS-Vereinigung e.V.
  - Niedersachsen – WOLFSBURG
    - LIBERO - Hilfe für das Kind mit Krankheiten des Nervensystems e.V.
  - Nordrhein-Westfalen – MÖNCHENGLADBACH
    - GBS Initiative e.V.
  - Nordrhein-Westfalen – OLPE
    - GBS Initiative e.V. (CIDPnetz)
- GRECIA
  - Attiki – ATHENS
    - The Greek Society for Systemic Autoimmune Diseases
- IRLANDA
  - County Wexford – ENNISCORTHY
    - Guillain-Barre Syndrome Ireland
  - Leinster – DUBLIN
    - IWA - Irish Wheelchair Association
- ITALIA
  - Abruzzo – L’Aquila
    - APAI - Associazione Patologie Autoimmuni Internazionale
- PAESI BASSI
  - Utrecht – BAARN
    - VSN - Vereniging Spierziekten Nederland
  - Zuid-Holland - DEN HAAG
    - PBF - Prinses Beatrix Fonds
- REGNO UNITO; GRAN BRETAGNA
  - Lincolnshire – LINCOLNSHIRE
    - GBSSG - Guillain-Barre Syndrome Support Group
- ROMANIA
  - BACAU
    - Organizatia trebuie- Bacau
- SVEZIA
  - Stockholms läns landsting – STOCKHOLM
    - Neurologiskt handikappades riksförbund

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Galli Volenterio A. “*Microbiologia degli alimenti*”. CEA, 2005
- [2] Murray P. R., Rosenthal K., Kobayashi G., S. Pfeller M.A. “*Microbiologia*”. EDISES, 2003
- [3] Secondo rapporto annuale comunitario dell’EFSA (European Food Safety Authority) sulle malattie infettive trasmissibili dagli animali all’uomo, 2006
- [4] Cascone V. *Le radiazioni ionizzanti per la conservazione dei prodotti ittici*. Appunti del Corso in Conservazione e Trasformazione Dei Prodotti dell’Acquacoltura, Scuola di Specializzazione in Allevamento, Igiene, Patologia delle Specie Acquatiche e Controllo dei Prodotti Derivati, Università degli studi di Udine
- [5] Nobile-Orazio E., Terenghi F., Versano A. *Patogenesi delle neuropatie disimmuni*. Dipartimento di Scienze Neurologiche. Università di Milano. In: <http://www.helpsalute.it>
- [6] Uncini A. *Neuropatia assonale e assonopatia funzionale motoria nella GBS*, Springer-Verlag 2005. Centro Regionale Malattie Neuromuscolare, Clinica Neurologica Ospedale clinicizzato “S.S. Annunziata”- Università degli Studi di Chieti e Pescara “G. d’Annunzio”. In: <http://www.helpsalute.it>
- [7] Micozzi A., Femia R., Mancini M. *Un paradigma persistente. Caso 16-2004 — Una donna di 76 anni, con intorpidimento e dolore ai piedi e alle gambe* di Anthony A. Amato, et al. 2004. In: <http://www.helpsalute.it>
- [8] Pavone L., Iannetti P., Polizzi A. *Prospettive in pediatria. Novità cliniche e terapeutiche sulle malattie demielinizzanti dell’infanzia in Neurologia pediatrica*. In: <http://www.helpsalute.it>
- [9] Primavera A. *Immunoglobuline in Clinica Neurologica- Meccanismi di azione delle IVIg*, Dipartimento di Neuroscienze dell’Università di Genova - Savona 2007. Zambon F. *Sindrome di Eaton-Lambert*. Università degli Studi di Padova. In: <http://www.helpsalute.it>
- [10] Vucic S., Kiernan M.C., Cornblath D.R. *Guillain-Barré syndrome: An update*. Journal of Clinical Neuroscience. 2009; 16: 733–741
- [11] Nielsen L.N., Sheppard S.K, McCarthy N.D., Maiden M.C.J., Ingmer H. and Krogfelt K.A. *MLST clustering of Campylobacter jejuni isolates from patients*

- with gastroenteritis, reactive arthritis and Guiallain Barrè Syndrome*. Journal of Applied Microbiology 2009; 12: 1-9
- [12] Nachamkin I., Engberg J., Gutacker M., Meinersman R.J., Chun Yan Li, Arzate P., Teeple E., Fussing V., Ho V.T., Asbury A.K., Griffin J.W., McKhann G.M., and Piffaretti J.C. *Molecular population genetic analysis of Campylobacter jejuni HS:19 associated with Guillain-Barrè Syndrome and Gastroenteritis*. The journal of infections disease 2001; 184: 221-226
- [13] Nachamkin I., Allos B.M. And Tony Ho. *Campylobacter Species and Guillain-Barrè Syndrome*. Clinical Microbiology Reviews 1998; Vol.11 n.3: 555–567
- [14] Dowling PC, Bosch VV, Cook SD. *Possible beneficial effect of high-dose intravenous steroid therapy in acute demyelinating disease and transverse myelitis*. Neurology 1980, 30: 33-36
- [15] Mangano K., Dati G., Quattrocchi C., Proietti L., Mazzarino C., Di Marco R., Bendtzen K., Greco B., Zaratin P., Nicoletti F. *Preventive and curative effects of cyclophosphamide in an animal model of Guillain Barrè syndrome*. Journal of Neuroimmunology 2008; 196: 107-115
- [16] Xiao-Dong Tan , Ying-Chun Dou , Chang-Wen Shi , Rui-Sheng Duan , Ruo-Peng Sun. *Administration of dehydroepiandrosterone ameliorates experimental autoimmune neuritis in Lewis rats*. Journal of Neuroimmunology 2009; 207: 39–44
- [17] Frenzen P. D. *Economic cost of Guillain-Barré syndrome in the United State*. Neurology 2008; 71: 21-27
- [18] Ching-Piao Tsai, Kai-Chen Wang, Chih-Yang Liu, Wen-Yung Sheng, Tzu-Chi Lee. *Pharmacoeconomics of therapy for Guillain–Barre´ syndrome: plasma exchange and intravenous immunoglobulin*. Journal of Clinical Neuroscience 2007; 14: 625–629
- [19] Giaccone V. “*Il regolamento comunitario 2073/05: considerazioni critiche ed esperienze su campionamenti e ricorsi*”. Corso di formazione del 28 novembre 2008, Brescia
- [20] REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005: *criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari*.
- [21] RACCOMANDAZIONE n.10122/09 del CONSIGLIO DELL’UNIONE EUROPEA

- [22] DECRETO L.vo del 18 maggio 2001, n. 279: *Istituzione della rete nazionale delle malattie rare e di esenzione dalla partecipazione al costo delle relative prestazioni sanitarie.*
- [23] COMMISSIONE EUROPEA DIREZIONE GENERALE SALUTE & TUTELA DEI CONSUMATORI: *Consultazione Pubblica Malattie Rare: Una Sfida Per L'Europa*
- [24] REGOLAMENTO (CE) N. 141/2000 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 16 dicembre 1999 *concernente i medicinali orfani*
- [25] Abbas A. K., Lichtman A. H. *“Fondamenti Di Immunologia”*, PICCIN; Padova, 2003
- [26] Anderson D.M., Michelle A.E., *“Mosby’s medical, nursing, & Allied Health Dictionary”*, PICCIN, New York, 2004
- [27] T. J., Goldsby R. A., Osborne B. A. *“Kuby Immunology”*, UTET, Torino, 2001
- [28] Kumar V.; Abbas A., Fausto N., *Robbins e Cotran. “Le Basi Patologiche delle Malattie”*, ELSEVIER, Torino, 2006
- [29] Bortolami R., Callegari E., Beghelli V. Capitolo 3 In: *“Anatomia e fisiologia degli animali domestici”*, EDAGRICOLE, Bologna, 2000
- [30] Waxman S. G., *Neuroanatomia Clinica*, PICCIN, Padova, 2006

## **BIBLIOGRAFIA SITI INTERNET**

- [1] [http:// www.adieta.it/malattie-alimenti](http://www.adieta.it/malattie-alimenti)
- [2] <http:// www.nutrionvalley.it>
- [3] <http://www.federica.unina.it>
- [4] <http://www.food-info.net>
- [5] <http://www.wikipedia.it/clostridium>
- [6] <http://www.sicurezza degli alimenti.it/campylobacter.htm>
- [7] <http://www.izsl.it>
- [8] <http://www.epicentro.iss.it>
- [9] <http://www.msd-italia.it>
- [10] <http://www.eufic.org>
- [11] <http://www.arpveneto.it>
- [12] <http://it.encarta.msn.com>
- [13] <http://www.circolodeglialimenti.it>
- [14] <http://www.ciboa360°.it>
- [15] <http://it.pfn.it>
- [16] <http://www.neuropatia.net/GBSneuropatieinfiammatorie.pdf>
- [17] [http://it.wikipedia.org/wiki/Sindrome\\_di\\_Guillain-Barr%C3%A9](http://it.wikipedia.org/wiki/Sindrome_di_Guillain-Barr%C3%A9)
- [18] <http://www.aicmt.org>
- [19] <http://www.orpha.net>
- [20] <http://www.gbsfi.com>
- [21] <http://www.helpsalute.it>
- [22] <http://www.medicoebambino.com>
- [23] <http://nvic.org/PressReleases/PR081507HPV.htm>
- [24] <http://www.vaers.hhs.gov>
- [25] <http://www.nvic.org>
- [26] <http://www.ec.europa.eu>
- [27] <http://www.eur-lex.europa.eu>
- [28] <http://www.camera.it>
- [29] <http://www.efsa.europa.eu>
- [30] <http://www.wikipedia.it/sistemaimmunitario>
- [31] <http://www.wikipedia.it/sistemanervoso>