

## CENTRO NAZIONALE DI RIFERIMENTO PER IL BOTULISMO



**Lucia Fenicia e Fabrizio Anniballi**

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, ISS*

**RIASSUNTO** - Differenti forme di botulismo sono state attualmente identificate, correlate alla tossina preformata negli alimenti (botulismo alimentare), conseguenti la moltiplicazione di clostridi neurotossigeni in ferite infette (botulismo da ferita) o la colonizzazione del tratto intestinale in neonati (botulismo infantile), ragazzi e/o adulti (botulismo da colonizzazione intestinale dell'adulto). La diagnosi di laboratorio nel caso del botulismo riveste un carattere di particolare urgenza sia per la necessità di un tempestivo intervento sul paziente che nell'individuazione dell'alimento anche in relazione al sistema di allerta nazionale e internazionale. Il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB) dell'Istituto Superiore di Sanità collabora con le diverse strutture del Servizio Sanitario Nazionale fornendo un supporto tecnico-scientifico per la conferma di laboratorio dei casi sospetti, per lo svolgimento delle indagini epidemiologiche e la raccolta di dati sui vari aspetti della malattia.

**Parole chiave:** botulismo, botulismo infantile, conferma di laboratorio, diagnosi

**SUMMARY** (*National Reference Centre for Botulism*) - Different forms of botulism have been recognized as being due to pre-formed toxin in food (foodborne botulism) or due to toxigenic organisms growing in a wound (wound botulism), or colonizing the intestinal tract of infant (infant botulism) or adult (adult intestinal colonization). The laboratory diagnosis of the botulism represents an important tool to define a rapid clinical therapy for the patient, other than to identify the suspected food in order to inform the European and Italian alert systems. The National Reference Centre for Botulism offers a technical and scientific support to the National Health Service Structures for laboratory confirmation of suspected cases, epidemiological investigations and data collection on different aspects of the disease.

**Key words:** botulism, infant botulism, laboratory confirmation, diagnosis

lucia.fenicia@iss.it

Presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) già da tempo sono presenti competenze microbiologiche specifiche in grado di effettuare la diagnosi di laboratorio dei casi sospetti di botulismo, fornire un tempestivo supporto al sospetto clinico di malattia quando necessario e supervisionare alle attività microbiologiche locali.

Il Ministero della Salute, con lettera del luglio 1988 e successivamente con Circolare n. 9 del luglio 1996, ha formalizzato il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB) presso l'ISS nell'ambito delle "misure di prevenzione e controllo delle intossicazioni da botulino".

Le notifiche dei casi sospetti vengono inviate dal Centro Nazionale di Sorveglianza e Promozione della Salute dell'ISS o dagli enti ospedalieri insieme ai campioni da sottoporre ad analisi.

L'attività fondamentale del CNRB, è quella di effettuare le indagini di laboratorio per una rapida diagnosi dei casi sospetti, sia alimentari sia infettivi; collaborare alla conduzione di indagini epidemiologiche sui sospetti per una tempestiva individuazione dei veicoli alimentari di malattia; ottimizzare il flusso informativo dei dati, l'analisi e il ritorno delle informazioni e l'approfondimento delle aree di ricerca specifiche quali quelle sui nuovi patogeni identificati e le condizioni di sviluppo. Attualmente sono state riconosciute diverse forme di botulismo causate dall'azione di ►

### Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

Numero diurno: 06 4990 2254

Numeri notturni e festivi: 06 4990 2440-2441

E-mail: [lucia.fenicia@iss.it](mailto:lucia.fenicia@iss.it); [fabrizio.anniballi@iss.it](mailto:fabrizio.anniballi@iss.it)

neurotossine prodotte dal *Clostridium botulinum* e più raramente da ceppi tossigeni di *Clostridium butyricum* e *Clostridium baratii*. In particolare, il *C. butyricum* è stato isolato per la prima volta in Italia, e successivamente in Cina, in India e recentemente in Giappone.

Oltre alla intossicazione dovuta alla neurotossina preformata negli alimenti (botulismo alimentare) esistono differenti forme dovute all'azione di tossina prodotta *in vivo* dal microrganismo che può svilupparsi in ferite infette (botulismo da ferita) o colonizzare il tratto intestinale di neonati (botulismo infantile), ragazzi e/o adulti (botulismo da colonizzazione intestinale dell'adulto).

A eccezione degli USA in cui il botulismo infantile è la forma più frequente della malattia, l'epidemiologia mondiale del botulismo vede l'intossicazione alimentare come forma predominante.

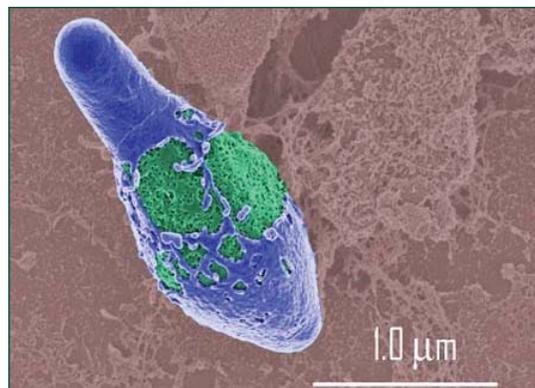
Nell'ambito della sicurezza alimentare il botulismo è considerato un grave pericolo per la salute pubblica in relazione soprattutto alla correlazione con alimenti conservati di origine industriale.

Lo studio della diffusione del botulismo si avvale di tecniche di studio specializzate nel campo della microbiologia umana e degli alimenti (incluse tecniche biotossicologiche) e di metodi della moderna epidemiologia classica e molecolare particolarmente idonei a indagare i focolai epidemici e misurare il rischio associato a specifiche esposizioni, con particolare interesse ad alimenti distribuiti commercialmente.

I dati epidemiologici a livello mondiale del botulismo, sia nella classica forma alimentare sia in quelle infettive, dipendono fondamentalmente dall'esistenza o meno di un sistema di sorveglianza accurato in cui le informazioni cliniche, epidemiologiche e microbiologiche siano tra loro sistematicamente integrate.



Conserva di fagiolini in acqua



Fotografia microscopica di una cellula di *Clostridium botulinum* in cui si evidenzia la struttura bastoncellare debordante

Per quanto riguarda poi il botulismo infettivo intestinale questo è a tutt'oggi poco conosciuto da parte dei clinici e sicuramente sottostimato. Infatti, nel mondo sono diagnosticati pochi casi di botulismo infantile e rarissimi di botulismo intestinale dell'adulto. Fanno eccezione gli USA dove il botulismo infantile è la forma più diffusa della malattia con 70-100 casi l'anno contro i 30 alimentari. L'*Infant Botulism Treatment and Prevention Program* (IBTPP), fondato e diretto da Stephen Arnon in California, effettua infatti un'attività di sensibilizzazione sia a livello medico sia presso la popolazione. Questo dimostra la stretta relazione tra informazione-sospetto diagnostico e individuazione dei casi.

Presso l'ISS già nel 1986 dopo lo studio dei primi casi, che presentavano peraltro delle particolari peculiarità in relazione a un nuovo agente etiologico identificato in un ceppo di *C. butyricum* produttore di tossina botulinica tipo E, è stato varato un programma *ad hoc* per lo studio e la sorveglianza attiva del botulismo infantile. Tale attività, che ha contribuito a sollevare l'attenzione sulla malattia, ha permesso di raccogliere numerosi dati sia clinici sia microbiologici riportati in articoli scientifici, e di dare un supporto ai clinici coinvolti facendo spesso da punto di raccordo con le strutture specializzate in collaborazione anche con l'IBTPP.

### Attività a livello nazionale

La diagnosi di laboratorio nel caso del botulismo riveste un carattere di particolare urgenza sia per la necessità di un tempestivo intervento sul paziente sia nell'individuazione dell'alimento, soprattutto nei



**Topini bianchi da laboratorio**

casi di coinvolgimento di prodotti industriali anche in relazione al sistema di allerta nazionale e internazionale.

Il CNRB (referente Lucia Fenicia), che opera presso il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare dell'ISS, è organizzato per ricevere campioni sia biologici sia alimentari inviati dalle varie strutture del Servizio Sanitario Nazionale (SSN), 24 ore su 24 sia nei giorni feriali sia festivi, previo contatto telefonico, e più in generale risponde ai quesiti posti dai sanitari o dai responsabili dei Servizi Sanitari Locali (numero diurno: **06 4990 2254**; numeri notturni e festivi: **06 4990 2440-2441**; email: [lucia.fenicia@iss.it](mailto:lucia.fenicia@iss.it); [fabrizio.anniballi@iss.it](mailto:fabrizio.anniballi@iss.it)). Il personale del CNRB, infatti, contattato tramite il Servizio di Sorveglianza dell'ISS, risponde anche in orari notturni e in giorni festivi dando le prime indicazioni di urgenza e indirizzando ai Centri Antiveneni competenti per il trattamento terapeutico o le modalità di reperimento del Siero Antibotulinico. Questo viene distribuito direttamente dal Ministero della Salute - Dipartimento Prevenzione e Comunicazione - che si avvale anche dei mezzi delle Forze dell'ordine per la massima rapidità di consegna.

Non è evento raro, infatti, l'intervento telefonico e la necessità di ricevere e iniziare immediatamente le analisi per la diagnosi di laboratorio anche in giorni festivi e in orari notturni. Tali analisi prevedono ricerche colturali e biotossicologiche, mediante l'uso di animali da laboratorio (*Mouse test*) al fine di evidenziare le tossine dei clostridi neurotossigeni. Accanto ai metodi classici standardizzati, negli ultimi anni le indagini vengono effettuate parallelamente mediante test biomolecolari.

Un momento fondamentale dell'attività del CNRB è costituito dal contatto telefonico diretto sia con i clinici sia soprattutto nei casi di botulismo infantile anche con i parenti dei pazienti. Questa attività fa sì che si instauri uno scambio di informazioni utili a identificare nuovi fattori di rischio e studiare nel tempo l'andamento della malattia. I quesiti che vengono posti al CNRB sono affrontati volta per volta con i dati a nostra disposizione, con i dati di letteratura e con l'ausilio di esperti anche stranieri. Lo scambio di informazioni e lo spirito collaborativo è uno dei punti basilari del nostro Servizio, spesso riconosciuto e incoraggiato da parte dei diversi interlocutori.

Tale sistema di sorveglianza, ha permesso una notevole raccolta di dati sia di natura microbiologica sia clinica. Al fine di ottimizzare l'analisi di tali dati su tutti casi segnalati e studiati e il ritorno delle informazioni è in corso di elaborazione uno specifico database e un sito web. Il Centro è inoltre a disposizione in ogni momento per chiarimenti sia sulle indagini di laboratorio sia sui vari aspetti della malattia.

Per quanto riguarda il flusso informativo, i risultati delle analisi, sia positivi sia negativi, vengono inviati tempestivamente all'ente ospedaliero che ha inviato i campioni, nonché al Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza Alimentare e il Dipartimento Prevenzione e Comunicazione del Ministero della Salute, e alle altre strutture dell'SSN che ne fanno richiesta. I dati dei casi confermati in laboratorio, nonché quelli collegati epidemiologicamente a casi confermati, vengono inviati annualmente dal Ministero della Salute all'ISTAT e riportati sul bollettino nazionale. ►



**Botulismo infantile. Alice in via di guarigione**

Nel 2007 è stato inoltre pubblicato, a cura del CDC europeo (Centers for Disease Control and Prevention), il primo Rapporto Epidemiologico che riporta tra l'altro la casistica del botulismo nell'Unione Europea (UE) dal 1995 al 2005.

L'Italia è a tutt'oggi, insieme alla Polonia, il Paese dell'UE che riconosce più casi di botulismo alimentare.

Dal 1984 al 2007, sono stati analizzati presso il CNRB campioni biologici e alimentari relativi a 750 sospetti casi di botulismo alimentare. Di questi, 283 sono stati confermati in laboratorio per un totale di 177 incidenti, con un'incidenza annuale di 0,02 per 100.000 persone. Il numero medio di casi per anno è 12 (range 0-33), e il numero medio di casi per incidente è 1,6 (range 1-9). Il più frequente veicolo dell'intossicazione (76,3 % degli alimenti confermati) è costituito da conserve casalinghe soprattutto di vegetali in olio e in acqua. Il numero più elevato di casi confermati (60,8%) è riportato nelle regioni del Sud Italia dove è più frequente l'abitudine alla preparazione di tali conserve.

Le conserve di produzione industriale molto raramente sono state implicate in casi di intossicazione botulinica. Dei 18 incidenti confermati in laboratorio (per un totale di 38 pazienti) 4 sono correlati a vegetali sott'olio, 4 a funghi sott'olio, 3 a olive in salamoia, 2 ad alimenti macrobiotici, e uno rispettivamente a salame, prosciutto, crema di tartufo, mascarpone e zuppa.

Una recente nuova evenienza nel nostro Paese è quella di casi di botulismo tra gli studenti fuorisede generalmente del Sud Italia che vivono in città del

Nord. Il veicolo dell'intossicazione è costituito da conserve casalinghe non correttamente preparate che i ragazzi portano con sé da casa al ritorno dalle vacanze.

In Italia, dal 1984 al 2007 sono stati diagnosticati 28 casi di botulismo infantile e 3 di botulismo intestinale dell'adulto. Per quanto riguarda la forma infantile il nostro Paese dopo gli USA, l'Argentina e il Canada, è quello con la casistica più numerosa, mentre nell'adulto - a nostra conoscenza - sono stati riportati rarissimi casi solo negli USA e uno in Giappone.

### Attività a livello comunitario

Nell'ambito del Gruppo di Lavoro del CEN/TC 275/WG6/TAG 3 "PCR for the detection of food-borne pathogens in food and animal feeding stuffs" esperti del Centro sono stati designati a partecipare al gruppo di redazione del metodo ISO di multiplex PCR (*Polymerase Chain Reaction*) per la determinazione dei clostridi produttori di neurotossine botuliniche.

Nell'ambito del VI Framework Europeo, i componenti del Centro partecipano al Progetto "Improved bio-traceability of unintended microorganisms and their substances in food and feed chains" (Biotracer). In tale Progetto il CNRB è inserito nella Task 15.1, che si occupa della determinazione e tracciabilità di microrganismi produttori di tossina botulinica naturalmente presenti o aggiunti volontariamente nelle derrate alimentari.

### Attività di ricerca

Il CNRB sviluppa ricerche nell'ambito delle varie forme di botulismo.

In particolare:

- presso il Centro esiste una ceppoteca di circa 400 ceppi di clostridi neurotossigeni (*C. botulinum* e *C. butyricum*) isolati in occasione dei casi di botulismo studiati. Su tali ceppi sono in corso studi per la caratterizzazione fenotipica e genetica;
- vengono effettuate indagini per verificare la prevalenza di spore di clostridi neurotossigeni in ambienti diversi e in indicatori ambientali quali il sale marino e il miele. Questo al fine anche di valutare il rischio correlato a questi due alimenti nell'ambito dell'utilizzazione nella tecnologia alimentare l'uno, e per l'insorgenza del botulismo infantile l'altro;



**Siero specifico BIG IV per il trattamento terapeutico contro il botulismo infantile, prodotto e distribuito dal California Department of Health Service**

- sono allo studio metodi alternativi all'uso degli animali da laboratorio per la ricerca di clostridi neurotossigeni mediante tecniche di biologia molecolare (Multiplex PCR);
- nel 2007 è stato inoltre approvato un progetto Italia-USA nell'ambito delle Malattie Rare dal titolo "Rare diseases: infant botulism". Tale Progetto, che prevede una stretta collaborazione con l'*Infant Botulism Treatment and Prevention Programme del California Department of Health Service-USA*, è articolato in tre unità operative interne ed esterne all'Istituto. L'obiettivo principale è quello di diffondere nel nostro Paese la conoscenza del botulismo infantile tramite programmi di informazione indirizzati a pediatri, neurologi, rianimatori e tossicologi clinici con

la collaborazione del Centro Antiveneni di Pavia. Tale informazione potrebbe essere diffusa tramite standardizzazione di protocolli terapeutici, compreso il trattamento con il siero specifico BIG IV, prodotto e distribuito dal California Department of Health Service negli USA, e altre misure terapeutiche. Saranno inoltre sviluppati metodi molecolari basati sull'utilizzo della Real-Time PCR per la determinazione dei clostridi produttori di tossina botulinica in matrici biologiche e alimentari. Sarà infine costituito, all'interno del sito web dell'ISS, una particolare sezione finalizzata alla diffusione di informazioni sui vari aspetti del botulismo infantile sia per quanto riguarda i dati di letteratura sia per quelli riferibili in particolare alla nostra casistica nazionale. ■

### Per saperne di più...

Mc Croskey LM, Hatheway CL, Fenicia L, et al. Characterization of an organism that produces type E botulin toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. *J Clin Microbiol* 1986;23:654-5.

Aureli P, Fenicia L, Pasolini B, et al. Two cases of type E infant botulism caused by neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* in Italy. *J Infect Dis* 1986;154:207-11.

Aureli P, Fenicia L, Ferrini AM, et al. Wound botulism: clinical and microbiological findings of an Italian case. *Eur J Epidemiol* 1992;8(5):750-2.

Fenicia L, Ferrini AM, Aureli P, et al. A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. *Eur J Epidemiol* 1993; 9:671-3.

Franciosa G, Fenicia L, Pourshaban M, et al. Recovery of a Strain of *Clostridium botulinum* Producing Both Neurotoxin A and Neurotoxin B from Canned Macrobiotic Food. *App and Envir Microb* 1997;63(3):1148-50.

Aureli P, Fenicia L, Franciosa G. Classic and emergent forms of botulism: the current status in Italy. *Eurosurveillance* 1999;4 (1).

Franciosa G, Pourshaban M, Gianfranceschi M, et al. *Clostridium botulinum* Spores and Toxin in Mascarpone Cheese and other milk Products. *J Food Prot* 1999;62 (8):867-71.

Fenicia L, Franciosa G, Pourshaban M, et al. Intestinal Toxemia Botulism in Two Young People, Caused by *Clostridium butyricum* type E. *Cl Infect Diseases* 1999;29;1381-7.

Anniballi F, Fenicia L, Franciosa G, et al. Influence of pH and temperature on the growth and toxin production by Neurotoxicogenic Strains of *Clostridium butyricum* Type E. *J Food Prot* 2002;65(8):1267-70.

Aureli P, Franciosa G, Fenicia L. Infant botulism and honey in Europe: a commentary. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21(9):866-8.

Pourshaban M, Franciosa G, Fenicia L, et al. Taxonomic identity of type E botulinum toxin-producing *Clostridium butyricum* strains sequencing of a short 16S rDNA region. *FEMS Microbiol Lett* 2002;27;214 (1):119.

Fenicia L, Da Dalt L, Anniballi F, et al. A case of infant Botulism due to Neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* Type E associated with *Clostridium difficile* colitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:736-8.

Fenicia L, Ferrini AM, Anniballi F, et al. Considering the antimicrobial sensitivity of the intestinal botulism agent *Clostridium butyricum* when treating concomitant infections. *Eur J Epidemiol* 2003;18:1153-4.

Fenicia L, Anniballi F, Pulitanò S, et al. A severe case of infant botulism caused by *Clostridium botulinum* type A with concomitant intestinal viral infections. *Eur J Pediatr* 2004;163:501-2.

Cawthorne A, Celentano LP, D'Ancona F, et al. Botulism and preserved green olives. *Emerg Infect Dis* 2005;11(5):781-2.

Fenicia L, Anniballi F, et al. SYBR green real-time PCR method to detect *Clostridium botulinum* type A. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:2891-6.

Fenicia L, Anniballi F, Aureli P. Intestinal toxemia botulism in Italy, 1984-2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:385-94.