

Corso di Laurea Specialistica in Scienze della
Nutrizione Umana
Università degli Studi di Roma –Tor Vergata–

CLOSTRIDI PATOGENI DEGLI ALIMENTI

Bruna Auricchio

Istituto Superiore di Sanità

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

GENERE *CLOSTRIDIUM*

- ü Il genere *Clostridium* comprende oltre 200 specie di bacilli Gram positivi anaerobi, che formano spore resistenti al calore. Sono in gran parte mobili per presenza di flagelli peritrichi e raramente capsulati, ma perdono la loro mobilità in presenza di ossigeno.
- ü Molti clostridi hanno metabolismo proteolitico o saccarolitico, diversi hanno entrambe le tipologie di metabolismo e pochissime specie né l'uno né l'altro.
- ü I microrganismi del genere *Clostridium* sono ubiquitari e possono essere isolati dal suolo, dall'acqua, dalla polvere, da sedimenti, da alimenti, da feci, da insetti e da materiale organico in decomposizione.

CLOSTRIDI PATOGENI DEGLI ALIMENTI

Clostridium botulinum

Clostridium butyricum

*Clostridium baratii**

Clostridium perfringens

* Solo sospettato di un caso alimentare: Harvey SM, Sturgeon J, Dassey DE. Botulism due to *Clostridium baratii* type F toxin. J Clin Microbiol 2002; 40 :2260-2

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

C. BOTULINUM

classificazione

- ü Basandosi sulle proprietà sierologiche delle neurotossine prodotte, i ceppi di *C. botulinum* sono divisi in sette sierotipi denominati con le lettere dalla A alla G.
- ü Tali ceppi, vengono classificati in quattro gruppi di organismi che possiedono caratteristiche metaboliche e fenotipiche diverse. I ceppi che causano il botulismo umano appartengono ai gruppi I e II e producono neurotossine tipo A, B, E, F.
- Ø Gruppo I: microrganismi proteolitici, mesofili, possono tollerare concentrazioni di cloruro di sodio dell'ordine del 10% ($A_w = 0.935$). Il loro pH minimo di crescita è 4.6. Le loro spore sono molto resistenti al calore. Producono le tossine A, B, F.
- Ø Gruppo II: microrganismi con metabolismo saccarolitico, sono psicrofili con temperatura ottimale di crescita di 26-30°C, ma possono crescere fino a 3°C, il loro pH minimo di crescita è 5 e la concentrazione di cloruro di sodio inibente è dell'ordine del 5% ($A_w = 0.96$). Producono le neurotossine tipo B, E, F.
- Ø Gruppo III: microrganismi responsabili del botulismo animale. Producono tossine tipo C e D e hanno caratteristiche metaboliche intermedie a quelle dei gruppi I e II.
- Ø Gruppo IV: *C. botulinum* tipo G. non è mai stato associato a casi di botulismo.
- Ø *Clostridium butyricum* produttore di neurotossina tipo E, e *Clostridium baratii* produttore di neurotossina tipo F formano due nuovi gruppi metabolici

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

C. PERFRINGENS

classificazione

- ü Produce diverse proteine biologicamente attive; alcune sono tossine altre enzimi. I ceppi sono classificati in 5 tipi indicati con le lettere dalla A alla E sulla base della produzione di 4 tossine extracellulari: α , β , ϵ , ι . Tutti i ceppi producono la tossina tipo α .
- ü La temperatura ottimale di crescita è generalmente compresa nell'intervallo 43-45 °C con un range di crescita nelle temperature di 15-50°C. A temperature di 60 °C le cellule vegetative sono velocemente inattivate.
- ü Il pH di crescita ottimale è compreso fra 6.0 e 7.0. La crescita è notevolmente limitata al di fuori dell'intervallo 5.0-8.3.

CONDIZIONI DI CRESCITA

C. botulinum

Anaerobiosi

Temperatura 18-40 °C

Temperatura minima 3.3 °C

pH minimo 4.6

Aw minima 0.935

% NaCl massima 10

C. perfringens

Anaerobiosi

Temperatura 15-50°C 43-45°C

Temperatura minima 6°C

pH minimo 5.0

Aw minima 0.95

% di NaCl massima 7-8%

MALATTIA

C. botulinum

Sindrome neuromuscolare conseguente l'attività di neurotossine che agiscono bloccando il rilascio di acetilcolina a livello delle giunzioni neuromuscolari

Esiste in 5 forme principali (alimentare, da ferita, infantile, intestinale dell'adulto, iatrogeno)

I casi di botulismo alimentare presentano episodi generalmente costituiti da 1-7 casi

Caratteristica dei paesi industrializzati

C. perfringens

• *Enterite da C. perfringens tipo A*

Diarrea con dolori addominali che compare dopo 8-20 ore si risolve anche in 24 ore. Generalmente gli episodi della malattia coinvolgono un elevato numero di casi (50-100) [ristorazione collettiva]

• *Enterite necrotizzante C. perfringens tipo C*

Diarrea sanguinolenta caratterizzata da dolori addominali e ostruzione della mucosa intestinale. Compare 1-5 dopo giorni dall'ingestione dell'alimento contaminato e può essere fatale.

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il botulismo si presenta in 6 differenti forme, con un'unica manifestazione clinica conseguente l'azione delle BoNTs.

ù La prima forma di botulismo riconosciuta è quella causata dall'ingestione di tossina preformata negli alimenti, nota come **botulismo alimentare**. *C. botulinum* può crescere ed elaborare le sue tossine in alimenti solo quando negli stessi si presentano le condizioni di anaerobiosi, basso contenuto salino o zuccherino ($A_w = 0.935$), e valori di pH maggiore di 4,5.

ù Il **botulismo da ferita** rappresenta la seconda forma di botulismo riconosciuta cronologicamente ed è causata dalla contaminazione di una ferita con le spore di *C. botulinum* provenienti dall'ambiente. Nella ferita le spore possono trovare condizioni tali da germinare e produrre tossina *in situ*. La sindrome clinica è indistinguibile dal botulismo alimentare eccetto per l'assenza dei sintomi gastroenterici e per la comparsa di febbre in alcuni casi.

ü La terza forma di botulismo riconosciuta è una sindrome da temporanea **colonizzazione intestinale** che riguarda i neonati fino ad un anno di età. Il **botulismo infantile** è una sindrome causata da clostridi neurotossigeni (*C. botulinum* e più raramente *C. butyricum* o *C. baratii*) che vengono ingeriti sotto forma di spora, sopravvivono all'acidità gastrica e raggiungono l'intestino. In conseguenza dell'immaturità della flora intestinale dell'ospite e quindi della competizione batterica, le spore possono germinare, moltiplicarsi, colonizzare temporaneamente il lume intestinale a livello del colon e produrre *in situ* la neurotossina. La mucosa intestinale non viene interessata dall'infezione. La presentazione clinica è la stessa degli adulti con la sintomatologia che include l'incapacità di suzione e di deglutizione, incoordinazione motoria del capo, alterazione del pianto.

ü Il **botulismo da colonizzazione intestinale dell'adulto** è una forma estremamente rara in tutto il mondo ed è il risultato della produzione della tossina nel lume intestinale di adulti e ragazzi. Tipicamente i pazienti presentano alcune anomalie anatomiche o funzionali dell'intestino oppure sono sottoposti a terapie antimicrobiche prolungate, che possono permettere la colonizzazione.

ü **Il botulismo da inalazione o/e rilascio involontario** di tossina non è una forma naturale della malattia. Il primo episodio di botulismo da inalazione è stato descritto in Germania e ha coinvolto due tecnici di laboratorio. Potrebbe essere la forma di botulismo caratteristica di un attacco bioterroristico

ü La più recente manifestazione clinica del botulismo è causata dall'erronea iniezione della tossina botulinica per uso terapeutico o cosmetico (**botulismo iatrogeno**).

DIAGNOSI

Si effettua su base clinica, epidemiologica, conferma di laboratorio

Conferma di laboratorio casi di botulismo

rinvenimento tox in siero, feci, alimento sospetto, spore in feci e alimento sospetto

Conferma di laboratorio casi di enterite da C. perfringens

10^5 / g in feci provenienti da due o più pazienti

10^5 / g in alimenti sospetto

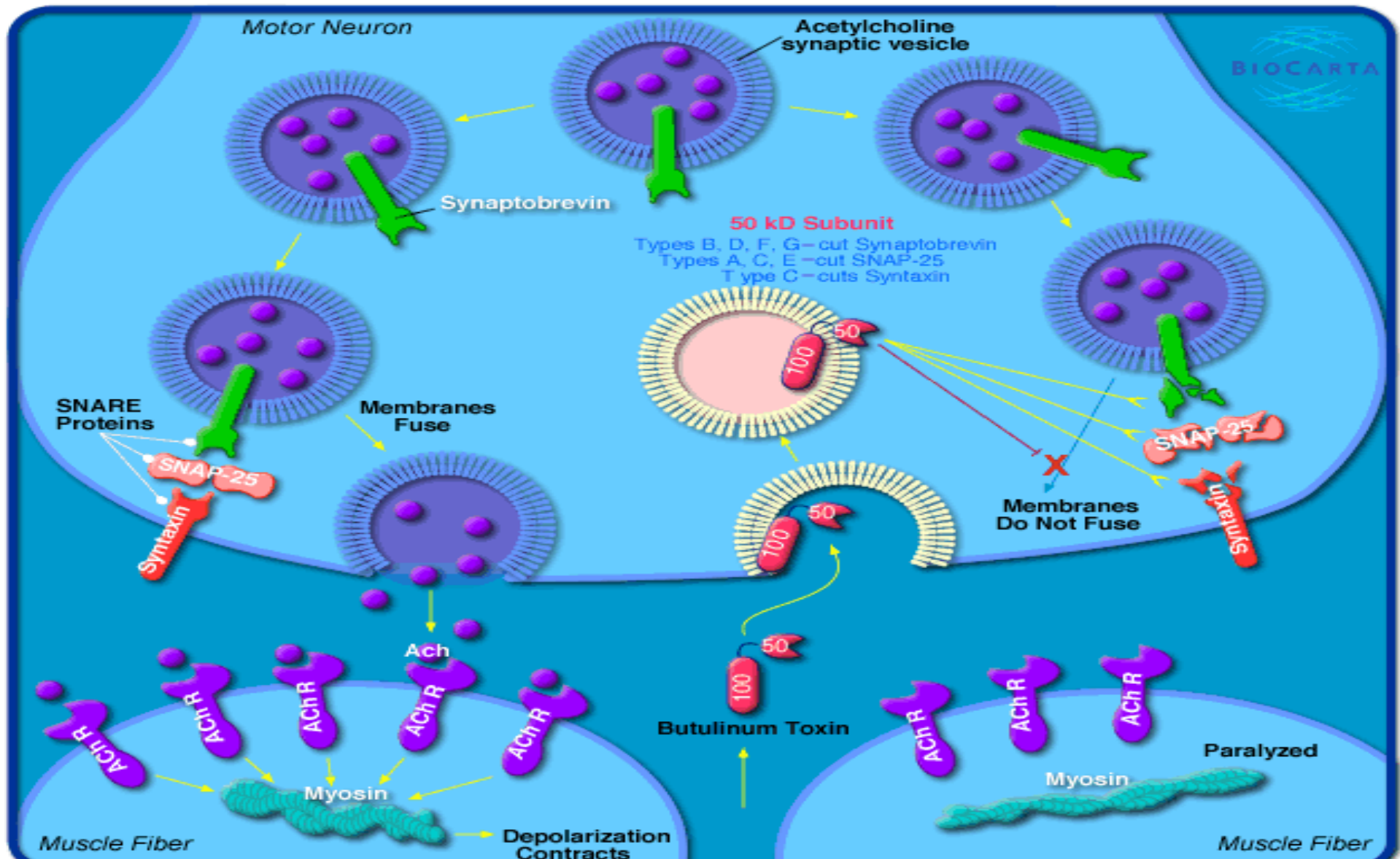
rinvenimento di tox in feci di due o più pazienti o/e alimento

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

DIAGNOSI

La sindrome clinica del botulismo consiste nella paralisi simmetrica dei nervi cranici, seguita da una paralisi flaccida simmetrica e discendente che può progredire fino all'arresto respiratorio. Importante è l'anidrosi con severa secchezza delle bocca e della gola. Nel botulismo alimentare, prima della comparsa dei sintomi neurologici possono essere presenti anche i sintomi gastroenterici di nausea e vomito. La costipazione è un sintomo universale ed è di natura neurologica. La funzione respiratoria e cardiaca rimangono generalmente normali, con la conservazione della normale pressione sanguigna, solo in alcuni casi si verifica ipotensione. Il sistema sensorio non è affetto e le funzioni intellettuali sono preservate. La morte risulta dall'ostruzione delle vie aeree provocata dalla paralisi dei muscoli faringei, diaframmatici e dai muscoli accessori della respirazione. La malattia può essere confusa con la sindrome di Guillaume Barré, la miastenia gravis, la sindrome di Eaton-Lambert, l'intossicazione da alcool, l'overdose di droghe, encefaliti o meningiti. La paralisi si risolve generalmente in settimane o mesi e spesso necessita di terapia riabilitativa.

MECCANISMO DI AZIONE DELLE TOSSINE BOTULINICHE



PATOGENESI DI *C.PERFRINGENS*

Le cellule contenute nell'alimento che riescono a sopravvivere dopo il transito nello stomaco si moltiplicano rapidamente nell'intestino e sporulano liberando enterotossine.

Alfa-tossina

Provoca aumento della permeabilità capillare, rafforza il flusso sanguigno nel tenue e provoca diarrea con dolori addominali

Beta-tossina

provoca lesioni necrotiche nell'intestino tenue, viene inattivata dalle proteasi intestinali come a tripsina. La patologia si manifesta in quei soggetti che hanno diminuita attività proteasica a livello intestinale

EPIDEMIOLOGIA

botulismo

Il botulismo alimentare risulta essere la forma prevalente in tutto il mondo e il 90% dei casi è associato al consumo di conserve preparate in ambito domestico. La maggioranza dei casi è attribuibile a conserve vegetali, più raramente di carne e a base di pesce. Molto raramente gli alimenti di produzione industriale sono coinvolti in episodi di botulismo alimentare.

Un piccolissimo quantitativo di tossina (30 ng) è sufficiente per provocare la malattia e perfino la morte. Il consumo di piccolissimi quantitativi di alimenti contaminati (0,1 g) può provocare la malattia. Nel botulismo alimentare i sintomi possono iniziare da 2 ore a 8 giorni dopo l'ingestione, ma generalmente compaiono tra le 12 e le 72 ore.

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

C. botulinum tipo A è predominante negli Stati Uniti occidentali, Cina, Argentina, ed è associato generalmente ai vegetali. In Europa, gli episodi di botulismo sono generalmente associati a *C. botulinum* tipo B e gli alimenti maggiormente coinvolti risultano essere carne e vegetali. I ceppi di *C. botulinum* tipo E sono associati ad alimenti marini e sono i principali responsabili di episodi di botulismo nelle regioni costiere e fredde. I casi di botulismo da colonizzazione intestinale dell'adulto sono estremamente rari. In Italia sono stati riportati solo 3 casi. Negli ultimi anni stanno invece aumentando i casi di botulismo da ferita soprattutto fra i consumatori di droghe iniettabili, al punto che nel Regno Unito, rappresentano la forma di botulismo più comune con oltre 120 casi riportati nel periodo 2000-2005. Nel botulismo da ferita i sintomi compaiono generalmente da 4 a 14 giorni dopo la contaminazione della ferita.

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

PREVENZIONE

ü Le misure di controllo dei casi di botulismo alimentare prevedono trattamenti che impediscono la germinazione e la tossinogenesi, o, secondariamente, l'inattivazione delle tossine già prodotte (trattamento termico ad una temperatura di almeno 85°C a cuore, per 10 minuti).

ü I trattamenti consistono in:

- Ø acidificazione mediante fermentazione acida o aggiunta di acidificanti in modo da ottenere un pH finale < 4.5;
- Ø aggiunta di soluti come sale o zucchero fino a raggiungere un valore di acqua libera (A_w) < 0,935 [= salamoia NaCl 10%];
- Ø aggiunta di additivi e conservanti (nitriti, polifosfati, acido sorbico, nisina, ecc.)
- Ø sterilizzazione industriale (121°C 15 min) per tutti quegli alimenti che non possono essere sottoposti ai trattamenti indicati. Per ottenere lo stesso effetto della sterilizzazione industriale occorre bollire il prodotto per 7-10 ore.

TIPOLOGIE DI ALIMENTI A RISCHIO BOTULISMO

Conserve di vegetali in olio e in salamoia/acqua

Carne conservata

Conserve di pesce

Formaggi

Alimenti macrobiotici

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

TIPOLOGIE DI ALIMENTI NON A RISCHIO BOTULISMO

Passata di pomodoro: l'acidità del pomodoro non consente la moltiplicazione e la tossinogenesi di *C. botulinum* eventualmente presenti.

Marmellate di frutta: solitamente il contenuto in zucchero delle marmellate non consente la moltiplicazione e la tossinogenesi di *C. botulinum*.

Sottaceto: i sottaceto non rappresentano un rischio in quanto il basso valore di pH < 4.5 non consente la germinazione e la tossinogenesi di *C. botulinum*.

Miele: il miele solitamente contiene spore di Clostridi e anche *C. botulinum* può essere presente. L'elevato contenuto di zucchero non ne permette però la moltiplicazione tossinogenesi. Il miele può rappresentare un rischio in caso di assunzione in lattanti con età inferiore ad 1 anno per quanto riguarda il botulismo infantile ma solo come **veicolo di spore**. L'assunzione di miele in bambini con età maggiore di un anno e in adulti (che presentano una flora intestinale matura) **non rappresenta** alcun rischio di botulismo.

ALIMENTI MAGGIORMENTE IMPLICATI IN CASI DI ENTERITE DA *C. PERFRINGENS*

carne cotta

(manzo, maiale, pollame)

sughi di carne

salse

minestre

C. PERFRINGENS

CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

Cottura completa degli alimenti

Conservazione a temperature $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o/e $>70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Riscaldamento degli alimenti immediatamente prima dell'assunzione in modo da raggiunge internamente una temperatura di almeno $75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo