



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

# Procedura operativa per la ricerca di Tossine botuliniche e di Clostridi produttori di tossine botuliniche Metodo colturale e mouse test

T. Bogdanova



Il **botulismo** è una malattia in comune tra uomini e animali.

È causato dall'assorbimento, nell'organismo, di una specifica neurotossina botulinica.

I ceppi produttori di tossine botuliniche tipo A, B, E, F, H sono principalmente correlati al botulismo umano.

*C. botulinum* tipo G è stato associato al momento soltanto ad un caso di botulismo da ferita nell'uomo.

I ceppi produttori di tossine tipo C e D e di mosaici CD e DC sono correlati al botulismo animale.



Il **botulismo animale** può colpire i bovini, gli equini, gli ovini, i caprini, i polli, gli uccelli acquatici, ed in minor misura i suini, i cani e i gatti.

Il *Clostridium botulinum* si può trovare nel letame, nel fieno in decomposizione, nell'acqua stagnante contaminata da materiale organico in disfacimento, negli insilati mal conservati.



## Le 5 forme di **botulismo umano**:

- ✓ Alimentare
- ✓ Infantile
- ✓ Da ferita
- ✓ Iatrogeno
- ✓ Da inalazione



Il botulismo alimentare risulta essere la forma prevalente in tutto il mondo.





## ALIMENTI INCRIMINATI

### ✓ Produzioni casalinghe

- Conserve vegetali sott'olio e in acqua
- Prosciutto casalingo
- Tonno casalingo
- Insaccati

### ✓ Conserve industriali

- REPFED (Refrigerated Processed Food of Extended Durability)
- Conserve sott'olio



## Refrigerated Processed Food of Extended Durability (REFPED)

- Alimenti non sterilizzati sottoposti a blando trattamento termico e refrigerati (es: insalata di mare, minestrone pasteurizzato) con shelf life relativamente breve
- La sicurezza dei REPFED dipende dalla combinazione di:
  - ✓ trattamenti termici minimi (70°C-95°C)
  - ✓ conservazione in condizione di refrigerazione ( $\leq 8^{\circ}\text{C}$ )
  - ✓ vita commerciale limitata ( $\leq 42$  giorni)



Il principale rischio microbiologico per tali prodotti è costituito da *C. botulinum* non proteolitico, in grado di produrre tossina botulinica a basse temperature



## Tipologia di materiale da sottoporre ad analisi

### **Botulismo animale:**

mangimi, organi interni (intestino, fegato), contenuto gastrico, siero, campioni ambientali.

### **Botulismo umano:**

alimenti e residui di alimenti/pasti, campioni biologici (feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti e organi interni), colture di arricchimento





## Campionamento ufficiale in un sospetto focolaio di botulismo

Prelevatori: ASL Servizio di igiene degli alimenti e della nutrizione (SIAN) e Servizio Veterinario competenti per il territorio

Campioni: alimenti sospetti (residui dei pasti, materie prime, conserve domestiche, ecc.), alimenti sospetti in confezioni integre







Generalmente, in caso di sospetta tossinfezione alimentare, il CNRB analizza i residui e gli IIZZSS le confezioni originali integre,

per non precludere all'operatore del settore alimentare la possibilità di richiedere la revisione dell'analisi.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## **POS MIC 024 NOR rev.1**

Ricerca di Clostridi produttori di tossine  
botuliniche e di Tossine botuliniche.  
(Metodo colturale e Mouse test)

Norma di riferimento: **CNRB30.001 rev.1**



Il metodo si applica alla ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche responsabili del botulismo umano ed animale.

Campo di applicazione:

campioni alimentari, mangimi, campioni biologici (siero, feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti, organi interni), campioni ambientali e colture di arricchimento.



## PRINCIPIO DEL METODO

- ✓ **Ricerca delle tossine botuliniche** presenti nel campione mediante inoculazione intraperitoneale di topini da laboratorio (mouse test)
- ✓ **Ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche** mediante semina del campione da analizzare in idonei terreni colturali di arricchimento





## Tecniche:

### ✓ **Colturale**

- colture batteriche in brodi di arricchimento
- isolamento di colonie (parte opzionale)

### ✓ **Mouse test**

- ricerca di tossina preformata
- ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche



## Terreni colturali e substrati biologici

### ✓ Tecnica colturale

Campioni alimentari

- brodi di arricchimento:
  - *Tryptone Peptone Glucose Yeast extract broth (TPGY )*
  - *Tryptone Peptone Glucose Yeast extract broth tamponato*  
(TPGY tamponato)
- terreno di isolamento
  - Egg Yolk Agar (EYA)



## Campioni botulismo animale:

- brodo di arricchimento
  - *Cooked Meat Fortificato (CMF)*
- terreno di isolamento
  - *McClung Toabe Medium (MCTM)*

**Mouse test** (metodo "gold standard" per la ricerca delle tossine botuliniche)

- *Tampone Fosfato Gelatina*
- *Topini bianchi da laboratorio (*Mus musculus*) del peso di 15-30 g*



I campioni devono essere mantenuti in condizioni di refrigerazione, preferibilmente non congelati, ed esaminati prima possibile.

Gli alimenti dovrebbero essere mantenuti possibilmente nel loro contenitore originale.

I campioni devono essere aperti in una cappa di sicurezza biologica, oppure, in alternativa, all'interno di una ampia busta di plastica per evitare la formazione di aerosol.



**Prima di aprire gli alimenti inscatolati, pulire il coperchio con acqua e sapone, sciacquare, rimuovere l'eccesso di acqua e asciugare con l'alcol etilico al 70%.**

**I contenitori con i fondelli deformati dovrebbero essere raffreddati prima dell'apertura.**





## Ricerca di tossine botuliniche preformate

### Preparazione del campione per l'inoculo

Campioni di siero	1 ml di siero t.q. x provetta	Temperatura ambiente per 30 minuti
Campioni liquidi (alimenti, mangimi ed estratti) e/o contenenti una fase acquosa	Omogeneizzare il campione. Centrifugare l'aliquota per 20 minuti a 8000 x g. Raccogliere il surnatante	Incubare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti.
Campioni solidi (alimenti, mangimi, feci, tessuti, organi interni) e/o contenenti una fase oleosa	1 : 1 Campione /TFG Per i campioni disidratati aggiungere più TFG	(3± 2)°C per almeno 30 minuti (è possibile lasciare in frigo overnight)



## MOUSE TEST

Inoculazione intraperitoneale degli animali  
(in doppio) :

Osservazione per 72 ore



Provetta n°1	1 ml di filtrato tal quale	morti
Provetta n°2	1 ml di filtrato addizionato con antitossina polivalente (anti A, B, E)/ (prov. 2 anti A, B, E : prov. 4 anti C, D)	vivi
Provetta n°3	1 ml di filtrato trattato termicamente a 100°C per 10'	vivi



Nel caso di analisi di campioni per i quali non sussista la condizione di urgenza analitica, al fine di limitare il più possibile il numero di animali utilizzati a fini scientifici (Decreto Legislativo n. 26 del 14 marzo 2014), *inoculare gli animali con il campione di cui alle provette n. 1 e n. 3 .....*

Provetta n°1	1 ml di filtrato tal quale	morti
Provetta n°3	1 ml di filtrato trattato termicamente a 100°C per 10'	vivi



.....e solo in caso di positività (morte dei soli animali inoculati con il campione della provetta n. 1) inoculare nuovamente gli animali con il campione di cui alla provetta n. 1 e con il campione di cui alla provetta n. 2.

Provetta n°1	1 ml di filtrato tal quale	morti
Provetta n°2	1 ml di filtrato addizionato con antitossina polivalente (anti A, B, E)	vivi





## Ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche

Preparazione del campione e allestimento delle colture di arricchimento

Può essere utile effettuare l'osservazione microscopica.

I clostridi produttori di tossine botuliniche sono bastoncelli sporigeni Gram positivi.

Spore:

- *C. botulinum* - debordante sub-terminale, assume la forma di una racchetta da tennis;
- *C. butyricum* - non debordante centrale, assume la forma di una spilla da balia;
- *C. baratii* - non debordante, sub-terminale.





Può essere utile eseguire la misurazione del pH e dell' $a_w$

A valori di  $pH < 4.6$  e di  $a_w < 0.935$  i clostridi produttori di tossine botuliniche non sono in grado di crescere e produrre le tossine botuliniche.

È altresì utile la valutazione dei caratteri organolettici dell'alimento.



## Preparazione del campione e allestimento delle colture di arricchimento

Campioni alimentari e mangimi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bollire TPGY x 10 min;</li> <li>- Raffreddare fino a 70°C;</li> <li>- Trattare il terreno seminato a 70°C x 10 min</li> </ul>	<p>Utilizzare il CMF per la ricerca di ceppi relativi al botulismo animale.</p> <p>2 gg in anaerobiosi</p>
Residui di campioni alimentari e mangimi/ Campioni disidratati	<p>Campione/ TPGY (CMF) 1:1</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bollire TPGY x 10 min</li> <li>- Raffreddare fino a 70°C</li> </ul>	<p>2 ml di sospensione + 9 ml TPGY/CMF</p>
Miele	<p>Campione a 50°C x 30 min;</p> <p>25 g + 50 ml (H<sub>2</sub>O + Tween 80); centrifugare 8000 x g x 30 min; filtrare la fase</p>	<p>Filtro + 9 ml TPGY</p> <p>Sedimento + 9 ml TPGY</p>

liquida



## Preparazione del campione e allestimento delle colture di arricchimento

Tamponi rettali	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bollire TPGY x 10 min</li> <li>- Raffreddare fino a 70°C</li> </ul>	1-2 tamponi rettali + 9 ml TPGY
Lavaggi intestinali (enema)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bollire TPGY/CMF x 10 min</li> <li>- Raffreddare fino a 70°C</li> </ul>	1-2 ml di campione + 9 ml TPGY
Campioni fecali, tessuti ed organi interni	Campione/ TFGY (CMF) 1:1 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bollire TPGY x 10 min</li> <li>- Raffreddare fino a 70°C</li> </ul>	2 ml di sospensione + 9 ml TPGY/CMF
Essudato da ferita	Campione/ TFGY (CMF) 1:1 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bollire TPGY x 10 min</li> <li>- Raffreddare fino a 70°C</li> </ul>	2 ml di sospensione + 98 ml TPGY/CMF
Colture di arricchimento	Utilizzare il campione t.q.	< 3 ml 1-2 ml di camp. + 9 ml di TPGY





Incubare in condizioni di anaerobiosi alla temperatura di  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per  $96 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .

Se dopo tale periodo la coltura non presenta crescita microbica (assenza di torbidità e di produzione di gas), protrarre l'incubazione per ulteriori 8 giorni.

Dopo quest'ulteriore periodo di incubazione, in assenza di crescita microbica, il campione può essere considerato **negativo**, **senza necessità di effettuare ulteriori analisi**.



## Ricerca e tipizzazione delle tossine botuliniche nelle colture di arricchimento

Centrifugare almeno 5 ml della brodocoltura a 8000 x g per 20 min; filtrare con i filtri di 0.45 µm.

Provetta n°1	1 ml di filtrato tal quale	morti
Provetta n°2	1 ml di filtrato addizionato con antitossina polivalente (anti A, B, E)/ (prov.2 anti A, B, E + prov. 4 anti C, D)	vivi
Provetta n°3	1 ml di filtrato trattato termicamente a 100°C per 10'	vivi



Qualora la ricerca risultasse positiva, effettuare la tipizzazione della tossina utilizzando lo stesso surnatante diluito 1:10 con TFG sterile

### *Botulismo umano*

Provetta n°1	1 ml di filtrato tal quale	morti
Provette n°2,3,4,5	1 ml di filtrato addizionato con le antitossine anti A, B, E, F	morti neg vivo pos

### *Botulismo animale*

Provetta n°1	1 ml di filtrato tal quale	morti
Provette n°2,3,4,5, 6, 7	1 ml di filtrato addizionato con le antitossine anti A, B, C, D, E, F, G	morti neg vivo pos



La tipizzazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche nelle colture di arricchimento, può essere effettuata **anche mediante PCR.**

In ottemperanza alle disposizioni del Decreto Legislativo n. 26 del 14 marzo 2014 "Attuazione della Direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici", è fatto obbligo, dove possibile, di utilizzare metodiche analitiche alternative all'uso degli animali.



## Isolamento di colonie pure di clostridi produttori di tossine botuliniche – parte opzionale

*L'isolamento delle colonie non è rilevante ai fini dell'espressione del risultato.*

Il risultato fa riferimento alla presenza o assenza di clostridi produttori di tossine botuliniche, ma non definisce la specie batterica produttrice delle tossine stesse.

Contemporaneamente al mouse test per la valutazione della tossicità delle colture di arricchimento, è possibile effettuare dalle colture stesse, degli strisci di isolamento in piastre di EYA o MCTM (preridotto).

Incubare le piastre in anaerobiosi a  $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$  per  $(48 \pm 2)$  h.





## Le colonie tipiche di *C. botulinum*

### EYA e MCTM appaiono:

- *generalmente* rugose con contorno irregolare, con superficie iridescente quando osservate a luce obliqua (azione della lipasi);
- un aspetto perlaceo e si estende anche oltre la colonia;
- le colonie di *tipo C, D ed E* circondate da una zona (2-4 mm) da unalone di lecitinasi.

## Le colonie tipiche di *C. butyricum* e *C. baratii*

- lipasi negative;
- di colore chiaro, leggermente trasparenti con margini irregolari quasi piatte.



## Espressione dei risultati

- ✓ Qualora sia stata rilevata la presenza di tossine botuliniche nel campione esaminato, il risultato si esprime come:
  - **Tossine botuliniche presenti;**
- ✓ Qualora non sia stata rilevata la presenza di tossine botuliniche nel campione esaminato, il risultato si esprime come:
  - **Tossine botuliniche assenti;**
- ✓ Qualora sia stata rilevata la presenza di clostridi produttori di tossine botuliniche nel campione esaminato, il risultato si esprime come:
  - **C. produttori di tossine botuliniche presenti;**
- ✓ Qualora non sia stata rilevata la presenza di clostridi produttori di tossine botuliniche nel campione esaminato, il risultato si esprime come:
  - **C. produttori di tossine botuliniche assenti.**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Grazie per



l'attenzione!

