

## CORSO MICROBIOLOGIA ALIMENTARE:

### *Clostridi*

#### 1.0 GENERALITA'

Il genere *Clostridium* fu identificato da Prazmowski nel 1880 e comprende attualmente circa 200 specie. Si tratta di bacilli Gram + (talora debolmente Gram -) anaerobi, raramente capsulati e in gran parte mobili per la presenza di flagelli peritrichi; riducono il solfito con produzione di solfuri e generano spore termoresistenti e stabili nell'ambiente, generalmente a localizzazione terminale o subterminale. La temperatura è un parametro discriminante per i clostridi: ad esempio, alcuni ceppi di *C. perfringens* sono molto sensibili all'azione del calore, mentre altri lo sono meno. I clostridi sono batteri ubiquitari che si possono trovare in varie matrici come acqua, suolo, polvere, feci, insetti, alimenti e materiale organico in decomposizione. Sono batteri privi di citocromi, catalasi e perossidasi negativi, che presentano metabolismo proteolitico o saccarolitico.

Il genere comprende specie note tra cui *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens*, microrganismi che causano patologie anche gravi nell'uomo.

*Clostridium tetani* non è causa di tossinfezioni alimentari ed è l'agente eziologico del tetano, malattia evocata dalla produzione di una tossina che agisce sul sistema nervoso centrale provocando spasmi muscolari violenti ed incontrollabili, che possono sfociare in paralisi spastica. La spora prodotta da tale microrganismo è definita "mazza di tamburo", per la sua posizione terminale e forma rotondeggiante.

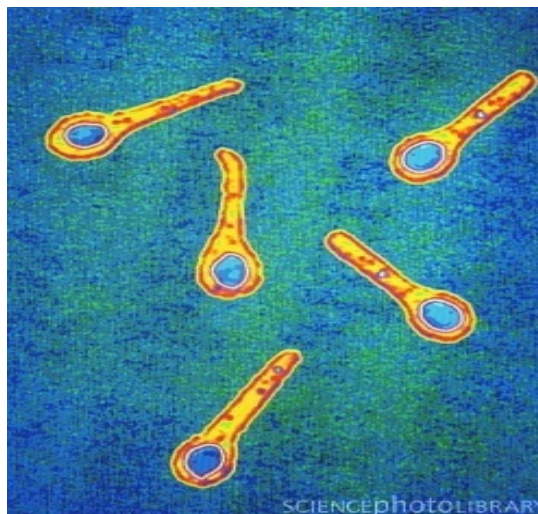


Fig. 1: Spore di *Clostridium tetani* al microscopio. (www.pforster.ch)

## 2.0 CLOSTRIDI E TOSSINFEZIONI ALIMENTARI

*Clostridium botulinum* e *Clostridium perfringens* sono causa di patologie trasmesse da alimenti più o meno gravi in dipendenza del soggetto e della carica batterica presente nel prodotto ingerito.

Il botulismo è una malattia paralizzante causata dalla tossina prodotta dal batterio *Clostridium botulinum*, intossicazione che prende il nome dal termine latino "*botulus*" (salsiccia) perché la sua descrizione fu associata inizialmente al consumo di salsicce preparate in casa. Oggi tuttavia, questa denominazione potrebbe essere fuorviante dato che *C. botulinum* si trova ben più frequentemente in preparati di origine vegetale che non in prodotti derivati da animali.

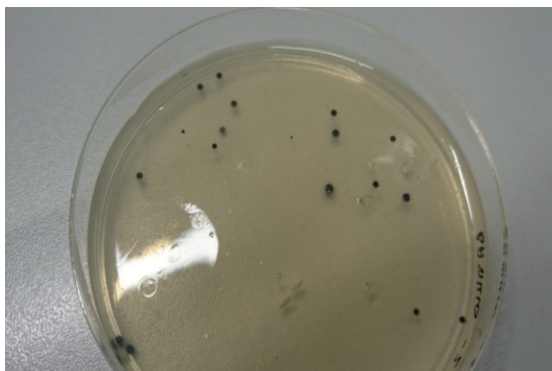
I primi sintomi del botulismo alimentare sono vomito, nausea e stipsi, ai quali seguono disturbi legati all'interessamento dei nervi cranici con visione confusa; si verifica poi la progressiva paralisi flaccida a carico dei muscoli scheletrici. La prognosi è spesso infausta anche se il tasso di mortalità negli ultimi anni si è ridotto notevolmente grazie sia agli interventi di prevenzione e controllo sugli alimenti, sia per l'adeguata terapia di sostegno con l'impiego di moderne tecniche di respirazione artificiale assistita. Il trattamento della tossina botulinica è possibile solo con la somministrazione di un'antitossina nelle prime ore dalla comparsa dei sintomi ed il recupero è molto lento.

In generale, tutti i cibi conservati che non vengono fatti cuocere e che hanno un basso grado di acidità (pH sopra il 4,6), possono costituire un ambiente adatto alla crescita del botulino. La tossina botulinica è stata ritrovata in alimenti molto diversi come mais in scatola, peperoni, fagiolini, melanzane, barbabietole, funghi, spinaci, olive, tonno, paté, affettati sotto vuoto, pesce conservato e mascarpone. Secondo i dati dei CDC americani, il principale veicolo della tossina botulinica è rappresentato proprio da verdure in scatola, seguito dalle conserve di pesce. I prodotti caseari, le conserve di carne e il pollame costituiscono invece un veicolo minore, anche se non sono del tutto esenti da rischi (come ha dimostrato la comparsa del botulino in una partita di mascarpone italiano nel 1996). Si può affermare che oltre il 90% dei casi di botulismo alimentare mondiale è legato al consumo di conserve artigianali o casalinghe sott'olio; di seguito si riportano le linee guida emanate dall'Istituto Superiore di Sanità per la preparazione di conserve in ambito domestico.

Particolare forma di botulismo è il botulismo infantile causato dall'ingestione di spore, le cui fonti sono state individuate in alcuni cibi che rientrano nell'alimentazione del lattante; le spore presenti nell'alimento, a differenza di quanto accade nell'adulto o in bambini al di sopra dell'anno di età, sono in grado di germinare a livello del colon, con conseguente produzione di tossina. Il quadro clinico è molto ampio e va da forme quasi asintomatiche fino alla morte. Tra gli alimenti per la prima infanzia i maggiori sospetti si sono appuntati sul miele, nonostante esso sia da ritenersi non solo uno dei cibi più sani, ma anche uno dei più sicuri dal punto di vista microbiologico. Il miele non è indispensabile per l'alimentazione infantile e quindi il rischio di veicolare il botulismo con il miele può facilmente essere eliminato. Queste considerazioni hanno portato alla raccomandazione diffusa dall'autorità sanitaria statunitense (FDA) di non somministrare miele a bambini di meno di un anno di età.

Il botulino non rappresenta l'unica specie appartenente al genere dei *Clostridi* capace di provocare malattie trasmissibili con gli alimenti: *C. perfringens* è responsabile di tossinfezioni associate all'ingestione di carne cotta, prodotti a base di carne non conservata e relativi sughi, pasticci o

passati di piselli prodotti su scala industriale nei servizi di ristorazione collettiva, case di cura e istituzioni simili.



**Fig. 2:** *Clostridium perfringens* in terreno di coltura *Perfringens Agar Base*

Pressoché tutte le epidemie si verificano a causa del lento raffreddamento o della conservazione senza refrigerazione che permettono a *C. perfringens* di moltiplicarsi, con il raggiungimento di una carica batterica di  $10^7$ - $10^8$  UFC/g produttrice dell'endotossina. La patologia si manifesta dopo 8-20 ore dall'ingestione dell'alimento contaminato con diarrea e dolori addominali; occasionalmente si possono verificare decessi, di solito in pazienti anziani. L'enterotossina di *C. perfringens* è termolabile: il riscaldamento a 60°C per 5 minuti ne distrugge l'attività biologica.

Le misure fondamentali da adottare per la prevenzione delle malattie di origine alimentare causate da clostridi sono:

- cottura adeguata dei cibi;
- raffreddamento rapido dei cibi;
- conservazione degli alimenti sottovuoto a temperature di refrigerazione. I clostridi sono batteri anaerobi e possono quindi moltiplicarsi e produrre tossine in ambiente sottovuoto privo di ossigeno;
- evitare il consumo di conserve in barattoli bombati e rigonfi. I clostridi producono gas che causa il gonfiamento delle confezioni dei cibi;
- lavaggio accurato di frutta e verdura.

## **2.1 LINEE GUIDA PER LA PRODUZIONE DI CONSERVE FATTE IN CASA**

La preparazione domestica di conserve alimentari è un'abitudine diffusa nel nostro Paese, tendenza che vive nel desiderio di produrre cibi più salubri e meno costosi.

In questo contesto è importante fornire al consumatore indicazioni accurate per la corretta preparazione e conservazione di questi prodotti in modo da prevenire il rischio botulino.

Particolare riguardo deve essere posto all'igiene personale e della cucina; il semplice lavaggio delle mani con sapone e acqua calda associato alla frizione meccanica asporta dalla pelle gran parte dei microrganismi che vi sono presenti. Per quanto riguarda le stoviglie, devono essere lavate con

apposito detergente e risciacquate con abbondante acqua per eliminarne i residui di cibo e polvere, fonte di microrganismi patogeni come il botulino.

I contenitori che verranno utilizzati nella preparazione delle conserve sono estremamente importanti: devono essere utilizzati contenitori di capacità commisurata al consumo. Non utilizzate contenitori troppo grandi per evitare di conservare in frigorifero le conserve aperte per periodi troppo lunghi. Il vetro è il materiale migliore, anche se possono essere utilizzati contenitori in metallo. Il vetro infatti, se rimane perfettamente integro, può essere riutilizzato innumerevoli volte e può essere facilmente lavato anche in lavastoviglie e sterilizzato. Inoltre essendo trasparente permette un'immediata ispezione dei prodotti conservati, consentendo di evidenziare eventuali anomalie senza aprire il barattolo. Le capsule e le guarnizioni a differenza dei vasetti, dovrebbero essere sostituite ad ogni utilizzo per garantire la loro tenuta ermetica. I contenitori e i coperchi devono essere perfettamente puliti e lavati con acqua e detergente prima del loro utilizzo. È importante risciacquarli attentamente in modo da eliminare residui di detergente che potrebbero conferire al prodotto odori e colori innaturali, nonché problemi di salute al consumatore derivante dalle sostanze chimiche presenti nel prodotto sanificante. Prima dell'uso i contenitori devono essere perfettamente asciutti. Per asciugarli è conveniente lasciarli scolare e poi utilizzare panni o carta assorbente che non lasciano residui tessili o pelucchi. Se si utilizzano barattoli sanificati a bagnomaria non è necessario asciugarli, e si possono lasciare in acqua fino al momento dell'utilizzo. Le pentole per la cottura delle conserve devono essere in acciaio inox: pentole in alluminio o rame non dovrebbero essere utilizzate, soprattutto se si utilizzano per cuocere conserve acide, poiché l'acidità potrebbe provocare rilasci metallici nel prodotto. È importante considerare che il livello di acqua del bagnomaria deve superare di almeno 5 cm il tappo dei barattoli. Per facilitare il prelievo dei barattoli immersi in acqua sono disponibili in commercio delle pentole equipaggiate con appositi cestelli metallici.

È necessario lavare le materie prime sotto acqua corrente in modo da eliminare le particelle di terra ed altri eventuali residui. L'immersione per qualche minuto in acqua contenente bicarbonato di sodio può essere utile per ridurre le tracce di pesticidi dalla superficie esterna dei vegetali. Il trattamento a cui devono essere sottoposti i contenitori dipende anche dalle modalità con cui verranno poi riempiti. Se il riempimento sarà fatto con prodotti freddi, non è necessario sanificare in acqua i contenitori, ma piuttosto è consigliabile utilizzare contenitori perfettamente puliti ed asciutti. Se il riempimento viene fatto a caldo, la sanificazione e la successiva conservazione dei barattoli in acqua calda fino al loro utilizzo evita che il contenitore stesso subisca shock termici durante le fasi di riempimento. I contenitori non vanno mai riempiti fino all'orlo, ma è necessario lasciare uno spazio vuoto che viene definito "spazio di testa", necessario perché si generi il vuoto. terminate le operazioni di riempimento, prima della chiusura del contenitore è necessario pulirne accuratamente il collo utilizzando carta assorbente o un panno che non lasci pelucchi, al fine di asportare eventuali tracce di prodotto o di liquido. In questo modo la chiusura sarà ottimale. Trascorse 12-24 ore dalla pastorizzazione, quando i contenitori saranno ben raffreddati, devono essere accuratamente ispezionati per valutare l'ermeticità della chiusura e il raggiungimento del vuoto. I tappi o le capsule di metallo dovranno apparire leggermente concavi (incurvati verso l'interno del contenitore). Premendo con il dito al centro della capsula o del tappo non si deve udire un "click clack". Un'ulteriore prova può essere fatta battendo con un cucchiaino sul tappo. Se il

tappo emette un suono metallico, la chiusura è ermetica e il contenitore sotto vuoto, se altrimenti emette un suono profondo, il contenitore non è sottovuoto.

Eventuali contenitori in cui non è stato fatto il vuoto e che non sono chiusi ermeticamente possono essere processati nuovamente avendo, però, cura di sostituire il tappo o la guarnizione. In alternativa devono essere consumati prima possibile, conservandoli in frigorifero per non più di sette giorni.

Tutti i barattoli correttamente chiusi possono essere a questo punto collocati nella dispensa ed etichettati. Nell'etichetta vanno indicate la tipologia di conserva e la data di preparazione. Prima dell'apertura di una conserva è necessario ispezionare visivamente il contenitore per evidenziare eventuali sversamenti di liquido e la perdita del vuoto. Se i tappi o le capsule metalliche appaiono convessi (incurvati verso l'alto) e premendo con il dito al loro centro si sente "click clack", i contenitori non sono più sottovuoto, a seguito dello sviluppo di microrganismi e conseguente produzione di gas. La stessa produzione di gas può essere valutata osservando se all'interno del contenitore si apprezzano bollicine di aria che dal fondo salgono verso l'alto.

Nel caso di perdita del vuoto e dell'ermeticità della chiusura la conserva non deve essere assaggiata né consumata.

### **3.0 MECCANISMO PATOGENETICO DI CLOSTRIDIUM BOTULINUM E CLOSTRIDIUM PERFRINGENS**

Per comprendere il meccanismo di azione della tossina botulina è importante conoscere la modalità di trasmissione delle informazioni all'interno del nostro organismo.

Il passaggio di informazioni tra due neuroni o il passaggio di un ordine tra un neurone ed una cellula bersaglio, come tra il motoneurone e la fibra muscolare che deve contrarsi, avviene attraverso contatti chiamati sinapsi. Il principale modo di comunicazione sinaptica implica l'emissione di un messaggero chimico o neurotrasmettitore dalle terminazioni nervose del neurone emettitore (detto neurone presinaptico) che è rivelato dalla cellula ricettrice (detta postsinaptica). I neurotrasmettitori, come l'acetilcolina, si trovano a livello delle terminazioni nervose all'interno di vescicole, ovvero strutture sferiche circondate da una membrana lipidica.

Al momento del comando di un movimento si instaurano una serie di meccanismi che permettono la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana della terminazione neuronale, con conseguente uscita del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico. Nel caso dell'acetilcolina, una volta liberata nello spazio sinaptico agisce a livello delle fibre muscolari provocando così la contrazione del muscolo.

Le neurotossine botuliniche sono delle proteine di circa 1.300 amminoacidi aventi un peso molecolare di 150 KDa, formate da 2 o più subunità (A-B); la subunità A è neurotossica, la B protegge la neurotossina dall'inattivazione da parte degli acidi dello stomaco. Una volta ingerite con l'alimento raggiungono per via ematogena le terminazioni nervose colinergiche, si legano ai recettori presinaptici delle cellule nervose bloccando il rilascio di acetilcolina e impedendo la contrazione muscolare con conseguente paralisi flaccida.

*Clostridium perfringens* agisce in maniera diversa rispetto al botulino; il microrganismo raggiunge l'intestino tenue, si moltiplica e va incontro a sporificazione. L'enterotossina si libera insieme alla spora con la lisi del microrganismo; una volta liberata la tossina si lega ai recettori delle cellule intestinali e permette la formazione di un canale proteico che altera la permeabilità di membrana, provocando ipersecrezione di liquidi ed elettroliti, con conseguente diarrea acquosa.

#### **4.0 CLOSTRIDI E ANTIBIOTICO RESISTENZA**

Come tutti i batteri anche i clostridi presentano profili di antibiotico resistenza.

Studi recenti effettuati su ceppi di *Clostridium perfringens* isolati da animali da allevamento hanno mostrato un incremento della resistenza ai chemioterapici di questo microrganismo, causa da ricercare non solo nell'inquinamento dell'ambiente dovuto ad un non corretto smaltimento dei rifiuti, ma anche ad un utilizzo erronei degli antibiotici in zootecnia.

Dati recenti indicano l'aumento della resistenza da parte di *C. perfringens* alla penicillina, cefalosporina, clindamicina e metronidazolo. Studi effettuati su tacchini in Germania mostrano la resistenza di *C. perfringens* nei confronti di eritromicina spectinomomicina, neomicina e colistina. Inoltre su ceppi isolati da feci suine sono stati rinvenuti ceppi multiresistenti a tetraciclina, eritromicina, clindamicina e lincomomicina.

## 5.0 BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. B. Griglio, G. Galvagno, G. Sattanino, M. Rossignoli, C. Musella. Il botulismo infantile: il ruolo del miele. AIVEMP, newsletter - n. 2 - aprile 2004.
2. Fabrizio Anniballi, Bruna Auricchio, Francesca Calvetti, Clemencia Chaves Lopez, Cosimo Marino Curiano, Marco Ianniello, Dario De Medici, Alfonsina Fiore, Sarah Guizzardi, Raffaello Lena, Carlo Locatelli, Davide Lonati, Giovanna Morini, Antonello Paparella, Maria Grazia Pompa, Annalisa Serio. linee guida per la corretta preparazione delle conserve alimentari in ambito domestico. Roma 2014. Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare Istituto Superiore di Sanità.
3. Giorgio Gilli. Professione igienista. Manuale dell'igiene ambientale e territoriale, Casa editrice ambrosiana, 2010. Lo Nostro Antonella, malattie trasmesse da alimenti pp 336-375.
4. Gholamiandehkordi A, Eeckhaut V, Lanckriet A, Timbermont L, Bjerrum L, Ducatelle R, Haesebrouck F, Van Immerseel F. Antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolates from broilers in Belgium.
5. J. S. Brazier, B. I. Duerden, V. Hall, J. E. Salmon, J. Hood, M. M. Brett, J. Mclauchlin and R. C. George. Isolation and identification of *Clostridium* spp. from infections associated with the injection of drugs: experiences of a microbiological investigation team. J. Med. Microbiol. — Vol. 51 (2002), 985–989, 2002 Society for General Microbiology.
6. Julian I. Rood, Eileen A. Maher, Eileen B. Somers, Elena Campos, Charles L. Duncan. Isolation and Characterization of Multiply Antibiotic-Resistant *Clostridium perfringens* Strains from Porcine Feces. antimicrobial agents and chemotherapy December 2014, Volume 58, Issue 12.
7. <http://www.med.unipg.it/ccl/Materiale%20Didattico/Microbiologia%20Perito/02.Batteriologia%20Speciale/14.Genere%20Clostridium%2002%2008%202012.pdf>
8. <http://www.uniroma2.it/didattica/Scien.Nutr.Umana/deposito/Clostridi.pdf>
9. <http://www.epicentro.iss.it/problemi/botulismo/botulismo.asp>
10. <http://www.epicentro.iss.it/problemi/botulismo/epid.asp>
11. <http://www.med.unipg.it/ccl/Materiale%20Didattico/Malattie%20Infettive%20%20canale%20B%20%28Francisci%29/Tossinfezioni%20alimentari%20e%20Botulismo.pdf>
12. <http://www.antimicrobe.org/b90.asp>
13. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications\\_%26\\_Documentation/docs/pdf/revue\\_plurithematique/2013/No09072013-00003-EN-Osman.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Publications_%26_Documentation/docs/pdf/revue_plurithematique/2013/No09072013-00003-EN-Osman.pdf)
14. [http://195.45.99.79/csra/index.php?option=com\\_content&task=view&id=95&Itemid=228](http://195.45.99.79/csra/index.php?option=com_content&task=view&id=95&Itemid=228)
15. Lucia Bonadonna e Massimo Ottaviani. . Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria. Rapporti ISTISAN 07/5, 2007. Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001.
16. Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Anna Maria D'Angelo, Rosella Marini *Clostridium perfringens* come indicatore di contaminazione ambientale e suo significato sanitario. Rapporti ISTISAN 02/8, 2002.

17. Parere del gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici a fronte di una richiesta della Commissione relativa alla presenza di specie di *Clostridium* spp negli alimenti. Adottato il 9-10 marzo 2005.
18. Unchalee Tansuphasiri, Wiriya Matra and Leelaowadee Sangsuk. Antimicrobial resistance among *Clostridium perfringens* isolated from various sources in Thailand.