



Ministero della Salute

DIREZIONE GENERALE PER L'IGIENE, LA SICUREZZA DEGLI
ALIMENTI E LA NUTRIZIONE

Ufficio 8

Viale Giorgio Ribotta, 5 - 00144 Roma

***Botulismo e sicurezza alimentare:
indirizzi operativi***

Indice

Indice.....	2
1. Obiettivi.....	4
2. Introduzione	4
3. Diagnosi di laboratorio e metodi di analisi	5
3.1. Campionamento	6
3.1.1 Campioni clinici	6
3.1.2 Campioni alimentari	7
3.2 Norme di igiene e sicurezza in laboratorio.....	10
3.3 Determinazioni analitiche preliminari.....	11
3.3.1 Determinazione del pH.....	11
3.3.2 Determinazione della water activity	13
3.4 Determinazione delle tossine botuliniche e dei clostridi produttori di tossine botuliniche in campioni clinici, alimentari e ambientali	13
4. L'inchiesta epidemiologica	15
4.1 Fondamenti di epidemiologia del botulismo alimentare in Italia	15
4.2 Plausibilità degli alimenti sospetti di essere coinvolti in casi/focolai di botulismo alimentare 16	
4.3 Modalità di prevenzione e controllo del botulismo alimentare.....	18
4.4 Conduzione dell'indagine epidemiologica.....	19
4.4.1 Il team di indagine	20
4.4.2 Le fasi	20
4.4.3 Indagini ambientali e sugli alimenti/ingredienti	22
4.4.4 Comunicazione con le altre Autorità competenti coinvolte e report finale	23

4.5 Attivazione del RASFF	23
Appendice 1.....	26
Appendice 2.....	28
Appendice 3.....	29

1. Obiettivi

L'obiettivo di questo documento è garantire la sicurezza alimentare attraverso l'adozione di tempestive misure a tutela della salute pubblica in occasione di incidenti di botulismo alimentare. Il documento fornisce indicazioni per individuare il più rapidamente possibile i potenziali veicoli alimentari responsabili dell'intossicazione e le modalità di conduzione delle analisi per la conferma di laboratorio. Il documento fornisce altresì elementi di dettaglio rispetto alle metodiche analitiche da adottare per la conferma di laboratorio e la tempistica con cui i laboratori devono garantire l'esecuzione delle analisi e la diffusione dei risultati alle Autorità competenti coinvolte nella gestione dell'incidente.

La necessità di fornire indirizzi operativi nasce dalle criticità emerse durante la gestione di recenti focolai di botulismo alimentare correlati al consumo di prodotti industriali presso esercizi di ristorazione. La prima è correlata alle modalità di conduzione dell'inchiesta epidemiologica. Una non corretta conduzione dell'inchiesta epidemiologica può portare, infatti, all'analisi di un elevatissimo numero di campioni ed alla diminuzione delle probabilità di identificazione del veicolo alimentare. La seconda criticità emersa è legata ai tempi di analisi ed alle procedure analitiche utilizzate durante la conferma di laboratorio. Avere a disposizione in tempi più brevi possibili i risultati analitici è *conditio sine qua non* per l'adozione tempestiva di quelle misure di sanità pubblica tese al contenimento della diffusione dell'intossicazione (eliminazione dal circuito commerciale dell'alimento tossico).

2. Introduzione

Il botulismo alimentare è una grave sindrome neuro-paralitica dovuta all'ingestione delle tossine botuliniche preformate negli alimenti. Il consumo di piccolissime quantità (dell'ordine di 0.1 g) di alimenti contaminati con le tossine botuliniche può essere sufficiente per determinare la malattia ed addirittura potrebbe dimostrarsi fatale. A titolo di esempio, in occasione di un esteso focolaio di botulismo verificatosi nel 2006 negli Stati Uniti ed in Canada, la dose letale di succo di carota contaminato fu stimata in 5 microlitri. In conseguenza dell'alta pericolosità delle tossine botuliniche, che rappresentano per l'uomo il più potente veleno naturale e che potrebbero potenzialmente essere utilizzate anche come arma batteriologica, ogni caso di botulismo dovrebbe essere considerato come una potenziale emergenza per la salute pubblica. La corretta gestione di un caso, e ancor più di un focolaio, richiede pertanto l'azione sinergica di diverse figure professionali afferenti al SSN e di diverse Autorità competenti.

Per evitare che un incidente di botulismo (caso o focolaio) possa diventare una potenziale emergenza è essenziale che il sospetto diagnostico venga formulato e notificato il più precocemente possibile. La precoce diagnosi clinica può essere ostacolata da una bassa familiarità dei medici con la malattia (dovuta alla sua rarità) e dall'aspecificità di alcuni sintomi e segni clinici, soprattutto all'esordio. Pur tuttavia, un'accurata anamnesi, che comprenda anche la scrupolosa ricostruzione della storia alimentare dei giorni precedenti

l'esordio sintomatologico e l'attento esame obiettivo del malato, possono essere altamente suggestivi per l'intossicazione botulinica. Infatti, nella maggior parte dei casi/focolai di botulismo in cui l'alimento viene poi identificato mediante analisi di laboratorio, la sua prima individuazione si colloca in fase anamnestica. Non di rado si sono verificate situazioni in cui il malato stesso è stato capace di identificare l'alimento contaminato portandolo con sé in pronto soccorso. Anche se questo flusso risulta molto veloce e spesso porta all'identificazione dell'alimento tossico, appare necessario che i medici ospedalieri coinvolgano tempestivamente il Dipartimento Prevenzione della ASL territorialmente (rispetto all'ospedale) competente per dare immediato avvio all'inchiesta epidemiologica e ad un'approfondita intervista dei malati e dei famigliari. Nel caso del botulismo la tempestività è essenziale sia per contenere il potenziale rischio di propagazione del focolaio, sia perché le condizioni cliniche del malato potrebbero impedire, nel caso comparisse disartria e/o insufficienza respiratoria, la raccolta di informazioni utili, in tempi brevi e certi.

3. Diagnosi di laboratorio e metodi di analisi

La diagnosi di laboratorio dei sospetti clinici, oltre ad escludere eventuali altre malattie a carico del sistema nervoso centrale che rientrano in diagnosi differenziale con il botulismo (es. sindrome di Guillain-Barré, sindrome di Miller-Fisher, miastenia gravis, sindrome di Lambert-Eaton), è essenziale per contenere il rischio di propagazione della malattia e per la corretta classificazione del caso a fini epidemiologici, così come prescritto dalla Decisione 2008/426/EC e s.m.i.

Tale diagnosi viene effettuata dimostrando la presenza delle tossine botuliniche nei campioni biologici come il siero, il vomito/contenuto gastrico, le feci, oppure nei residui alimentari consumati dai soggetti che presentano una sintomatologia caratteristica. Purtroppo la determinazione delle tossine botuliniche nei campioni biologici e nei residui alimentari non è sempre possibile per diverse ragioni. Infatti, le tossine rimangono in circolo nel torrente sanguigno solo per pochi giorni (generalmente 4-5 dopo la comparsa dei sintomi) dopodiché vengono metabolizzate. Negli alimenti, così come nei campioni fecali, possono invece subire fenomeni di denaturazione ad opera di proteasi batteriche o tissutali. Generalmente i clostridi produttori di tossine botuliniche sono più persistenti, in tutte le tipologie di campioni (ad eccezione del sangue, perché il botulismo non causa batteriemia). Per questa ragione, il riscontro di tali agenti microbici in campioni biologici prelevati da soggetti che presentano un quadro sintomatologico caratteristico, costituisce un criterio di laboratorio valido ai fini della conferma del sospetto clinico.

Per quanto concerne invece le analisi di laboratorio condotte sugli alimenti, la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche, ma non delle tossine botuliniche, deve essere valutata con estrema attenzione. Infatti, data l'ubiquitarità di tali microrganismi non si può scongiurare una possibile contaminazione delle conserve alimentari o delle materie prime utilizzate per la loro realizzazione. Tale contaminazione, tuttavia, può non costituire un rischio se le condizioni chimico-fisiche della conserva sono tali da impedire lo sviluppo e la conseguente tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Nei

casi in cui nei residui alimentari non vengono riscontrate le tossine botuliniche, ma si determinano i clostridi produttori di tossine botuliniche, la sub-tipizzazione molecolare degli isolati può essere di grande aiuto per effettuare la *source attribution*. A questo scopo è necessaria però la comparazione genetica di più isolati provenienti dai campioni biologici e dai residui alimentari positivi onde evitare che l'eventuale concomitante presenza, nella matrice alimentare, di più ceppi microbici della stessa specie, impedisca la corretta identificazione del veicolo alimentare.

3.1. Campionamento

3.1.1 Campioni clinici

La raccolta dei campioni clinici dovrebbe essere effettuata immediatamente dopo la formulazione del sospetto diagnostico e comunque prima dell'eventuale somministrazione dell'antidoto. Tutti i campioni utili per la diagnosi di laboratorio devono essere conservati fino al momento della spedizione al laboratorio in condizioni di refrigerazione (in frigorifero) e non congelati.

Il pacco con i campioni da inviare al laboratorio deve essere confezionato secondo le prescrizioni di cui alla Circolare del Ministero della Salute "Raccomandazioni per la sicurezza del trasporto di materiali infettivi e campioni diagnostici" dell'8 maggio 2003 n. 3. Una copia della Circolare Ministeriale è disponibile sia nel sito web del Ministero della Salute che nel sito web del Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (http://www.iss.it/binary/cnrb/cont/Circolare_spedizione_materiale.pdf). Tutti i campioni devono essere spediti al laboratorio con il codice identificativo internazionale UN3373 – materia biologica, categoria B. Particolare attenzione deve essere posta nel confezionamento del pacco soprattutto qualora fossero presenti barattoli in vetro che potrebbero rompersi durante il trasporto.

Unitamente ai campioni da sottoporre ad analisi il laboratorio dovrebbe ricevere anche una copia della scheda di segnalazione di sospetto botulismo di cui all'allegato 1 della Circolare del Ministero della Salute "Sorveglianza, prevenzione e misure di controllo del botulismo" del 12 ottobre 2012 n. 21834. Una copia della scheda può essere scaricata dal sito web del Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (http://www.iss.it/binary/cnrb/cont/Scheda_Botulismo_2012.pdf).

Nel caso del botulismo alimentare i campioni utili per la diagnosi di laboratorio sono:

- **Siero.** Il siero è il campione "gold standard" per la diagnosi di laboratorio, tuttavia può fornire risultati conclusivi soltanto se prelevato entro 4-5 giorni dalla comparsa dei sintomi/segni clinici della malattia. Trascorso tale periodo, infatti, è estremamente raro riscontrare le tossine botuliniche circolanti nel torrente sanguigno. Al laboratorio deve essere inviato siero e non sangue intero. Per la raccolta del siero devono essere utilizzate provette prive di additivi che solitamente sono provviste di tappo di uno dei seguenti colori: bianco, rosso, arancio, giallo. Il prelievo deve essere effettuato prima dell'inizio della terapia con l'antidoto. Il quantitativo ideale di siero da inviare al laboratorio è

pari a 10-15 ml, mentre quello minimo è pari a 3 ml. Quantitativi minori possono essere analizzati, ma potrebbero fornire risultati non conclusivi. Nel siero è possibile ricercare soltanto le tossine botuliniche in quanto il botulismo non determina batteriemia.

- **Feci.** Il campione fecale generalmente fornisce risultati analitici conclusivi per tempi più lunghi rispetto al siero. Nel campione fecale dovrebbero essere ricercate sia le tossine botuliniche che i clostridi produttori di tossine botuliniche. In caso di determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche e non delle tossine botuliniche, il criterio di laboratorio è soddisfatto solo in presenza di un quadro sintomatologico suggestivo per botulismo. Il quantitativo ideale di feci da analizzare è pari a 25-50 g, tuttavia è possibile analizzare anche quantitativi minimi (< di 1 g). Dal momento che la stipsi è un segno clinico del botulismo presente nella maggioranza dei casi, il campione fecale potrebbe non essere disponibile. In alternativa al campione fecale è possibile analizzare i tamponi rettali e il lavaggio dell'ampolla rettale (enema).
- **Tamponi rettali e lavaggio dell'ampolla rettale.** In alternativa al campione fecale, devono essere raccolti ed inviati al laboratorio sia i tamponi rettali che il lavaggio dell'ampolla rettale. Dapprima devono essere effettuati i tamponi rettali poi il lavaggio. Siccome i tamponi rettali generalmente contengono quantità minime di campione devono essere raccolti in quantità non inferiore a 4 preferendo i tamponi a secco rispetto a quelli contenenti il terreno di trasporto. Il lavaggio dell'ampolla rettale deve essere effettuato con 30 ml di acqua sterile non batteriostatica o in alternativa con soluzione fisiologica sterile. Dopo l'infusione del liquido si deve attendere almeno 30-60 secondi prima dell'aspirazione. Il liquido raccolto deve essere posto in un contenitore sterile. Nei tamponi rettali è possibile determinare soltanto i clostridi produttori di tossine botuliniche, mentre nel lavaggio dell'ampolla rettale dovrebbero essere ricercate anche le tossine botuliniche.
- **Contenuto gastrico e vomito.** Questi campioni si analizzano con una frequenza molto minore rispetto ai precedenti, tuttavia possono fornire risultati conclusivi. Nel contenuto gastrico e nel vomito dovrebbero essere ricercate sia le tossine botuliniche che i clostridi produttori di tossine botuliniche. In caso di determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche e non delle tossine botuliniche, il criterio di laboratorio è soddisfatto solo in presenza di un quadro sintomatologico suggestivo per botulismo. Il quantitativo ideale di campione da analizzare è pari a 25-50 g, tuttavia è possibile sottoporre ad analisi anche quantitativi minimi (< di 1 g).

3.1.2 Campioni alimentari

L'analisi dei residui alimentari consumati dai malati nei giorni precedenti alla comparsa dei sintomi nonché l'analisi di eventuali confezioni gemelle (appartenenti allo stesso lotto di produzione, se di origine industriale oppure preparate contemporaneamente ai residui identificati come possibili veicoli in caso di preparazioni domestiche) è molto importante anche al fine di limitare la possibile insorgenza di nuovi casi,

soprattutto se si sospetta che siano di produzione industriale. Nell'Appendice 3 (Figura 4) del presente documento sono indicati i punti salienti del campionamento, del conferimento dei campioni al laboratorio e delle modalità di esecuzione delle analisi.

Una comunicazione non tempestiva alle Autorità sanitarie dell'esito dei risultati analitici comporta difficoltà operative nell'adozione di misure immediate atte a tutelare la salute pubblica. Configurandosi il botulismo come una grave minaccia per la salute pubblica, è necessario procedere all'effettuazione delle analisi sul campione pervenuto in laboratorio senza indugio. La comunicazione agli OSA coinvolti della data e dell'orario di esecuzione delle suddette analisi, dovrà avvenire con la massima tempestività a mezzo casella PEC (legge 28 gennaio 2009, n.2 e Legge 17 dicembre 2012, n. 221) e, ove possibile, anche attraverso comunicazione orale, senza che questo comporti un ritardo nell'esecuzione dell'analisi stessa.

L'indicazione della PEC aziendale del professionista o della ditta individuale è obbligatoria con comunicazione alle rispettive camere di commercio, albi professionali, registri delle imprese ove è anche reperibile qualora non si trovi sull'eventuale sito web dell'OSA.

3.1.2.a Prodotti alimentari di produzione industriale in confezione aperta prelevati a livello domestico o presso esercizi commerciali

I prodotti alimentari di produzione industriale in confezione aperta prelevati a livello domestico o presso gli esercizi commerciali dove si presume siano stati consumati i pasti responsabili dell'intossicazione, devono essere preferibilmente conferiti al laboratorio nelle loro confezioni originali. Nel caso in cui le confezioni siano di grandi dimensioni è opportuno, quando possibile, prelevare almeno 250 g del contenuto (se il prodotto contiene due fasi prelevare sia la parte liquida che la parte solida). Per quanto concerne i residui alimentari è tuttavia possibile analizzare anche quantitativi minimi (< di 1 g). Talvolta può fornire risultati conclusivi anche l'analisi di barattoli o contenitori vuoti, purché non siano stati lavati in lavastoviglie o con detersivi. Se durante l'indagine epidemiologica si dovessero riscontrare preparazioni gemelle (anche di altro lotto) a quelle consumate dal malato, anch'esse dovrebbero essere campionate ed inviate al laboratorio.

Tali campioni in confezione aperta devono essere analizzati prima possibile da un laboratorio in grado di garantire:

- la ricezione degli stessi anche in giorni festivi;
- l'immediato inizio delle attività analitiche;
- l'adozione di metodiche analitiche rapide in grado di fornire i primi risultati entro 30 ore dall'avvio delle analisi.

Considerato che il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo presso l'ISS (viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma) raccoglie i ceppi microbici isolati da campioni clinici è opportuno, al fine di agevolare la correlazione con gli alimenti (*source attribution*), l'invio degli isolati da campioni alimentari al Centro stesso.

Qualora l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale competente per territorio non fosse nelle condizioni di garantire le modalità di conduzione delle analisi di cui sopra, tali campioni potranno essere inviati ad altro laboratorio della rete degli IZZSS (che garantisca le condizioni di cui sopra) oppure al Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma) che ha confermato la propria disponibilità.

Fatta salva la tempestività con cui devono essere svolte le analisi, nel caso in cui sia possibile dare avviso agli OSA interessati circa la data, l'ora e il luogo di apertura del campione e della conseguente esecuzione delle analisi, devono essere seguite le indicazioni sotto riportate:

- campionamento presso l'abitazione domestica di alimento acquistato sfuso – avviso al rivenditore;
- campionamento presso l'abitazione domestica di alimento acquistato confezionato – avviso al rivenditore e al produttore indicato in etichetta;
- campionamento presso l'esercizio di somministrazione - avviso al rivenditore e al produttore indicato in etichetta.

Tale avviso dovrà essere dato a mezzo PEC (Legge del 28 gennaio 2009, n.2 e Legge del 17 dicembre 2012 n. 221) e tramite comunicazione orale (Decreto legislativo del 28 luglio 1989 n. 271 art. 223 (1)).

3.1.2.b Prodotti alimentari di produzione industriale in confezione chiusa/integra

Gli alimenti di produzione industriale in confezione non aperta dovrebbero essere analizzati dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali per permettere al produttore di avvalersi della revisione di analisi, in caso di non conformità riscontrate in prima istanza. Anche in questo caso, il laboratorio deve garantire:

- la ricezione degli stessi anche in giorni festivi;
- l'immediato inizio delle attività analitiche;
- l'adozione di metodiche analitiche rapide in grado di fornire i primi risultati entro 30 ore dall'avvio delle analisi.

Qualora l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale non fosse nelle condizioni di garantire le modalità di conduzione delle analisi di cui sopra, tali campioni potranno essere inviati ad altro laboratorio della rete degli

IIZZSS (che garantisca le condizioni di cui sopra) oppure al Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma). Qualora le analisi vengano svolte presso il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo, il Centro stesso provvederà a dare avviso all'interessato (OSA) della data, ora e luogo dell'apertura del campione e della conseguente analisi. Tale avviso dovrà essere dato a mezzo PEC (Legge del 28 gennaio 2009, n.2 e Legge del 17 dicembre 2012 n. 221) e tramite comunicazione orale (Decreto legislativo del 28 luglio 1989 n. 271 art. 223 (1)). In quest'ultimo caso non sarà possibile per l'OSA avvalersi della revisione di analisi.

3.1.2.c Prodotti alimentari di produzione domestica

I prodotti alimentari di produzione domestica prelevati presso l'abitazione del malato o conferiti direttamente dallo stesso, devono essere inviati al laboratorio nelle loro confezioni originali. Nel caso in cui le confezioni siano di grandi dimensioni è opportuno, quando possibile, prelevare almeno 250 g del contenuto (se il prodotto contiene due fasi prelevare sia parte liquida che la parte solida). Per quanto concerne i residui alimentari è tuttavia possibile analizzare anche quantitativi minimi (< di 1 g). Talvolta può fornire risultati conclusivi anche l'analisi di barattoli o contenitori vuoti, purché non siano stati lavati in lavastoviglie o con detersivi. Se durante l'indagine epidemiologica si dovessero riscontrare preparazioni gemelle a quelle consumate dal malato, anch'esse dovrebbero essere campionate ed inviate al laboratorio. Anche in questo caso, il laboratorio deve garantire:

- la ricezione degli stessi anche in giorni festivi;
- l'immediato inizio delle attività analitiche;
- l'adozione di metodiche analitiche rapide in grado di fornire i primi risultati entro 30 ore dall'avvio delle analisi.

3.2 Norme di igiene e sicurezza in laboratorio

Le norme di igiene e sicurezza di seguito riportate, sono quelle espresse nel "CDC botulism manual". I clostridi produttori di tossine botuliniche finora identificati appartengono alla classe di rischio II ed agiscono attraverso la produzione di tossine. Minime quantità di tossina assunta per ingestione, inalazione o per assorbimento attraverso la congiuntiva o una ferita possono causare grave intossicazione e morte. Per questo motivo, tutti i campioni sospettati di contenere tossine botuliniche devono essere manipolati con cautela e solamente da personale appositamente addestrato.

Tutte le operazioni relative ai passaggi colturali devono essere pertanto svolte indossando obbligatoriamente il camice, i guanti ed eventualmente occhiali di protezione o visiera. È necessario da parte dell'operatore porre particolare attenzione nel togliere i guanti al momento della sospensione del lavoro e nell'indossarli al momento dell'avvio o della ripresa delle attività. Sia prima che al termine delle prove, l'operatore provvede al lavaggio delle mani con il sapone disinfettante. In caso di sversamento di materiale

sospettato di contenere tossina botulinica, questa può essere neutralizzata usando una soluzione 0.1M di idrossido di sodio. I clostridi produttori di tossine botuliniche vengono neutralizzati da una soluzione di ipoclorito di sodio (1 g/litro di cloro disponibile) per un tempo di contatto di 15-20 minuti o altro idoneo disinfettante. Per sversamenti di sangue o grandi quantità di materiale organico si raccomanda l'utilizzo di una soluzione di ipoclorito di sodio contenente 5 g/litro di cloro disponibile. Se il materiale sgocciolato contiene sia il microorganismo che la tossina si devono utilizzare in sequenza sia l'ipoclorito di sodio che l'idrossido di sodio.

Particolare attenzione deve essere posta durante le fasi di apertura del pacco contenente i campioni. Anche se il confezionamento dei campioni da inviare al laboratorio deve essere effettuato in maniera scrupolosa per evitare danni ad eventuali vasi/barattoli in vetro e per evitare lo sversamento di liquidi all'esterno dei contenitori, non è possibile escludere a priori che durante il trasporto i campioni possano aver subito sollecitazioni tali da provocarne la rottura. Durante la fase di apertura del pacco con i campioni gli operatori devono indossare tutti i dispositivi di protezione individuale e devono utilizzare la massima cautela per evitare la formazione di aerosol e di venire a contatto con eventuali vetri infranti presenti all'interno del pacco.

3.3 Determinazioni analitiche preliminari

La determinazione delle caratteristiche chimico-fisiche (pH e a_w) degli alimenti sospettati di essere veicolo del botulismo assumono un ruolo di primaria importanza in quanto, sono alla base delle strategie di controllo del rischio botulismo. Tali determinazioni quindi devono essere sempre effettuate, fatte salve quelle situazioni in cui il materiale pervenuto al laboratorio non è sufficiente. In quest'ultimo caso il laboratorio deve prioritariamente effettuare la determinazione delle tossine botuliniche e dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

3.3.1 Determinazione del pH

Il pH degli alimenti influenza la loro suscettibilità alla crescita microbica, e l'acidificazione, effettuata mediante aggiunta di agenti acidificati o mediante fermentazione, è nota come metodo per la conservazione di molti alimenti. Naturalmente il pH degli alimenti è estremamente variabile. Gli alimenti acidi sono quelli che hanno un pH naturale minore o uguale a 4.6. Gli alimenti poco acidi sono tutti quegli alimenti o conserve alimentari il cui pH finale è maggiore di 4.6 e la a_w maggiore di 0.85.

I campioni liquidi possono essere misurati tal quali per inserimento dell'elettrodo e della sonda per la compensazione della temperatura direttamente nel campione. L'unico accorgimento è quello di condizionare il campione alla temperatura degli standard certificati utilizzati per la calibrazione dello strumento. Qualora questi campioni siano fortemente acidi (es. aceto) è necessario disporre di un elettrodo in grado di supportare

misure in questo tipo di ambiente. In caso di determinazioni su prodotti contenenti gas disciolti che possono condizionare la misura del pH (es. CO₂, SO₃) è indispensabile evitare di omogeneizzare il campione in modo da non favorire l'eliminazione del gas ed infine effettuare le misure nel minor tempo possibile dal campionamento.

I campioni sott'olio o marinati devono essere privati dell'olio prima della misura del pH. Il campione può essere addizionato di un quantitativo di acqua distillata priva di CO₂, pari al 10% del peso del campione. Dopo omogeneizzazione in stomaker, se si lascia riposare la sospensione in un piano inclinato in pochi minuti si separeranno le due fasi (acquosa e grassa) e la determinazione può essere effettuata nella fase acquosa come descritto sopra. L'aggiunta di acqua distillata nelle proporzioni sopra indicate non modifica il pH dell'alimento in maniera significativa.

Se si analizzano emulsioni, è necessario effettuare la determinazione nella fase acquosa. La fase non polare può essere eliminata per estrazione in imbuto separatore con etere etilico oppure attraverso cicli di congelamento-scongelo. In questo ultimo caso è importante riportare la temperatura del campione vicina a quella degli standard utilizzati per la calibrazione.

Se i prodotti sono costituiti da una fase liquida e una solida, è auspicabile effettuare la determinazione del pH in entrambe le fasi separatamente e poi nella matrice tal quale. Può essere necessario ridurre la matrice in una pasta omogenea attraverso l'azione meccanica di un frullatore o di un mortaio.

Molto spesso gli alimenti, soprattutto le conserve, si presentano di una consistenza tale da permettere la presenza di gradienti di pH. Qualora in laboratorio si debbano effettuare misure del pH dell'alimento in seguito al sospetto che l'alimento stesso sia coinvolto in casi di tossinfezioni alimentari, è indispensabile effettuare le misurazioni senza alterare questi gradienti al fine di valutare se una sola porzione dell'alimento stesso ha un pH tale da supportare la crescita del patogeno in questione. A questo proposito in letteratura sono descritti diversi casi. Emblematico è un caso di botulismo alimentare legato al consumo di una conserva di pomodoro. Come noto le conserve di pomodoro di produzione domestica, successivamente alla fase di cottura e pastorizzazione in bagnomaria, diventano bifasiche per separazione della parte liquida (che occupa il fondo del vaso e contiene disciolti gli acidi naturali del pomodoro) da quella cremosa (che rimane in superficie). Le errate procedure di preparazione di questa conserva avevano permesso lo sviluppo di muffe sulla superficie. Conseguentemente allo sviluppo fungino il pH della frazione cremosa della conserva aveva subito un innalzamento fino a valori compatibili con la crescita e tossinogenesi di *C. botulinum*. In questo particolare caso, se il pH fosse stato misurato solo dopo omogeneizzazione del campione non sarebbe stato possibile rilevare il gradiente di pH con il rischio di giudicare erroneamente la conserva non capace di supportare crescita e tossinogenesi di *C. botulinum*.

3.3.2 Determinazione della water activity

Possono essere misurate due proprietà fondamentali dell'acqua contenuta in un alimento. La prima descrive la quantità totale di acqua presente in un alimento, mentre la seconda, descrive lo stato energetico dell'acqua di un alimento, ed è rappresentata dalla a_w . La a_w di un prodotto è uguale all'umidità relativa dell'aria in equilibrio con il prodotto in una camera di misura sigillata. Misurando e controllando la a_w di un alimento infatti è possibile stabilire quali microrganismi sono in grado di crescere su quella matrice, mantenere la stabilità chimica, mantenere sotto controllo eventuali reazioni non-enzimatiche o reazioni spontanee auto-catalitiche di ossidazione, prolungare l'attività di enzimi e vitamine, ottimizzare le proprietà fisiche dell'alimento in termini di shelf-life.

Per la determinazione della a_w esistono diversi metodi, basati sulla determinazione, diretta o indiretta, dell'umidità relativa dell'atmosfera in equilibrio con il campione alimentare. I metodi usati per la misura dovrebbero essere accurati, riproducibili, facili da eseguire e veloci. L'inconveniente che più spesso si incontra nella determinazione della a_w è dato dal tempo necessario per raggiungere l'equilibrio durante la misurazione. I metodi maggiormente utilizzati per la determinazione della a_w sono: determinazione della pressione del vapore utilizzando un manometro, metodi gravimetrici ed igrometrici, determinazione del punto di congelamento, determinazione del punto di rugiada.

I campioni da sottoporre a misurazione dell' a_w dovrebbero essere il più possibile uniformi. Alcuni prodotti devono essere sminuzzati senza provocare innalzamenti della temperatura (come potrebbe verificarsi nel caso di utilizzo di frullatori).

La determinazione del valore di a_w di emulsioni, specialmente emulsioni con acqua-olio, possono essere difficili da misurare con accuratezza in quanto i lipidi impediscono la visualizzazione della pressione del vapore. In questi casi l'emulsione deve essere rotta per mezzo di centrifugazione o attraverso diversi cicli di congelamento-scongelo e la determinazione deve essere fatta sulla fase acquosa, anche se la fase acquosa da sola, potrebbe non essere rappresentativa dell' a_w dell'intero campione, soprattutto se l'emulsione ha la capacità di legare l'acqua.

3.4 Determinazione delle tossine botuliniche e dei clostridi produttori di tossine botuliniche in campioni clinici, alimentari e ambientali

Le metodiche analitiche per la determinazione delle tossine botuliniche storicamente si avvalgono dell'utilizzo degli animali da laboratorio. Infatti fino ad oggi, anche se sono stati sviluppati diversi approcci analitici *in vitro*, l'unico metodo universalmente accettato è basato sulla prova biologica (mouse bioassay). In ottemperanza alle disposizioni di cui alla normativa comunitaria e nazionale in materia di protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo ha sviluppato una metodica analitica che riduce al minimo l'utilizzo degli animali senza compromettere il risultato analitico.

Per la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche è stato invece possibile sostituire la prova biologica con un metodo di PCR. A questo proposito, l'ISO ha sviluppato lo standard ISO/TS 17919:2013 "Microbiology of the food chain – polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E, and F neurotoxin-producing clostridia". Questo Standard non è stato adottato dal Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo in quanto il suo campo di applicazione non prevede l'analisi dei campioni clinici e perché il metodo sviluppato dal Centro attraverso un controllo di processo (non previsto nel metodo ISO) permette di verificare anche il processo di estrazione degli acidi nucleici.

Le metodiche analitiche in uso presso il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo sono state validate, accreditate in accordo con la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 e pubblicate, unitamente alle dichiarazioni di idoneità, nel proprio sito web www.iss.it/cnrb. Nelle Figure 1 e 2 di cui all'Appendice 1 del presente documento, sono riportati i diagrammi di flusso dei metodi in uso presso il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo, da cui è possibile evincere i tempi minimi e massimi di analisi. Per maggiori dettagli analitici si rimanda alle procedure pubblicate nel sito web www.iss.it/cnrb. Sulla pagina dedicata ai metodi analitici del Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo saranno pubblicati e mantenuti aggiornati anche i metodi rapidi in vitro la cui applicabilità è in fase di studio e validazione.

4. L'inchiesta epidemiologica

L'inchiesta epidemiologica assume un'importanza strategica ai fini della rapida identificazione dell'alimento veicolo dell'intossicazione e permettere alle Autorità competenti di mettere in atto tempestivamente tutti gli interventi di sanità pubblica. Nei paragrafi seguenti sono descritti analiticamente gli elementi fondamentali per la conduzione dell'inchiesta epidemiologica. In Appendice 2 (Figura 3) è riportato un albero delle decisioni indicativo, ma non esaustivo, in cui sono definiti gli step indispensabili per l'identificazione dell'alimento veicolo dell'intossicazione e per la sua conferma di laboratorio.

4.1 Fondamenti di epidemiologia del botulismo alimentare in Italia

Il botulismo alimentare è una malattia rara e nonostante l'Italia registri uno dei tassi di prevalenza maggiori di Europa, ogni anno vengono confermati in laboratorio circa 20 di casi, a fronte di circa 50 segnalazioni di sospetti clinici. Il numero di casi per ogni incidente di botulismo è pari a 1.5 e nella maggioranza degli incidenti, i focolai coinvolgono gruppi familiari che consumano conserve di produzione domestica. Le aree rurali del centro-sud Italia e in particolare di Campania, Puglia, Lazio, Sicilia e Calabria sono le zone in cui si registra il maggior numero di incidenti/anno. Nell'ultimo decennio si è assistito ad un incremento del numero dei casi notificati dall'Emilia Romagna e dal Piemonte che hanno coinvolto studenti fuori sede, residenti in queste regioni per motivi di studio, ma originari delle regioni meridionali, in particolare della Puglia.

Dall'analisi dei dati epidemiologici raccolti dal Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo in oltre 30 anni di sorveglianza, si osserva che l'alimento responsabile dell'intossicazione viene identificato mediante analisi di laboratorio solo nel 41% dei casi confermati e mediante l'inchiesta epidemiologica nel 30%. Nei restanti casi non è possibile individuare l'alimento tossico. Conserve vegetali in olio o in acqua/salamoia sono le tipologie di alimento più frequentemente coinvolte negli incidenti di botulismo confermati in laboratorio. Le tipologie di vegetali più frequentemente coinvolte sono i funghi in olio, le olive e le cime di rapa in olio.

Gli alimenti di produzione industriale sono coinvolti circa nel 27% dei casi di botulismo, pur tuttavia sono questi a destare maggiori preoccupazioni per la salute pubblica. Olive, funghi e cime di rapa in olio, sono anche in questo caso gli alimenti maggiormente coinvolti.

4.2 Plausibilità degli alimenti sospetti di essere coinvolti in casi/focolai di botulismo alimentare

L'indagine epidemiologica deve comportare necessariamente la raccolta puntuale di tutti gli alimenti consumati negli 8 giorni precedenti la comparsa dei sintomi clinici. Ciò al fine di individuare gli alimenti che per loro natura sono a rischio nonché consentire, nei casi in cui l'analisi sui prodotti individuati sia negativa, di risalire a possibili altri alimenti responsabili (es conserve con difetti di sterilizzazione).

Affinché un prodotto rappresenti un rischio per il botulismo devono verificarsi i seguenti eventi:

- Le materie prime devono essere contaminate con i clostridi produttori di tossine botuliniche;
- Le caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento devono essere favorevoli allo sviluppo e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche (anaerobiosi, $\text{pH} > 4.6$, $a_w > 0.93$);
- Il prodotto deve subire processi di sanificazione inefficaci alla distruzione dei clostridi produttori di tossine botuliniche;
- L'alimento deve essere consumato senza essere cucinato oppure il trattamento al calore applicato non è stato sufficiente per disattivare la tossina eventualmente presente.

Sono pertanto a rischio botulismo:

- le conserve e le semi-conserve poco acide (pH naturale > 4.6) o che hanno subito trattamenti di acidificazione inefficaci, sia in olio che in acqua;
- le conserve in salamoia che presentano $a_w > 0.93$;
- i prodotti denominati REPFED (REFrigerated Processed Food with Extended Durability) qualora non sia stata opportunamente mantenuta la catena del freddo;
- creme e salse non opportunamente acidificate/processate;
- alcuni prodotti macrobiotici come per esempio il seitan o il tofu;
- le conserve di produzione domestica a vocazione "etnica";
- le spezie in olio se non opportunamente acidificate o gli olii aromatizzati;
- i prodotti conservati mediante sottovuoto effettuato con apparecchiature disponibili a livello domestico.

Sono invece non a rischio botulismo:

- prodotti freschi;
- prodotti opportunamente cotti prima del consumo;
- prodotti congelati/surgelati/gelati;
- conserve acide o opportunamente acidificate;
- marmellate e confetture che contengono opportuni quantitativi di zucchero o combinazione di zucchero e agenti acidificanti;
- succhi di frutta acidificati;
- conserve di carne o di pesce sterilizzate o contenenti agenti acidificanti e conservanti (es. nitriti, sorbati);
- conserve in salamoia con $a_w \leq 0.93$.

Generalmente i prodotti contaminati con le tossine botuliniche si presentano con caratteristiche sensoriali alterate. Purtroppo tale alterazione può essere percepita dal consumatore in maniera soggettiva. Ad esempio l'appetibilità di un alimento può essere influenzata dalla presenza di spezie o di altri ingredienti che possono mascherare totalmente o parzialmente eventuali modificazioni sensoriali. Inoltre, in alcuni casi i consumatori possono non conoscere il naturale sapore di alcuni prodotti o conserve, soprattutto se questi hanno una forte connotazione regionale (es. cime di rapa, friarielli).

Molti prodotti sono sottoposti a processi minimali al fine di conservarne il più possibile le proprietà nutrizionali e la qualità sensoriale. Questi processi non hanno però alcun effetto sulle spore dei clostridi produttori di tossine botuliniche, anzi, distruggendo le comunità microbiche competitive naturalmente presenti nell'alimento, creano le condizioni ottimali, in caso di sviluppo microbico, per la coltura pura.

In particolare è necessario considerare come alimenti a rischio anche le nuove formulazioni alimentari (prodotti freschi pronti al consumo – REPFEDs) e le creme/salse utilizzate nella ristorazione commerciale. Questi ultimi prodotti di per sé non sarebbero pericolosi in quanto generalmente sono sottoposti a trattamenti tecnologici di acidificazione e stabilizzazione termica. Possono tuttavia costituire un fattore di rischio qualora vengano utilizzati in associazione con altri prodotti o basi cremose neutre che, alterando il pH finale del nuovo composto, permettono la crescita e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

Il miele non deve essere considerato un alimento a rischio botulismo alimentare, in quanto le sue caratteristiche chimico-fisiche non supportano lo sviluppo e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Il miele, tuttavia, può costituire un veicolo di spore e per questo viene spesso correlato al botulismo infantile. Per questa rara patologia, che interessa soltanto i lattanti con età inferiore ad un anno, le

spore eventualmente ingerite con l'alimento (e quindi anche con il miele), potrebbero moltiplicarsi nel lume intestinale producendo *in situ* le tossine responsabili del botulismo. Il consumo di miele contenente spore di clostridi produttori di tossine botuliniche non comporta alcun rischio per la salute in bambini con età superiore ad un anno e per gli adulti. Qualora le analisi di laboratorio correlate ai casi di botulismo infantile riscontrassero la presenza di spore di clostridi produttori di tossine botuliniche nel miele, non deve essere attivato il sistema di allerta RASFF.

4.3 Modalità di prevenzione e controllo del botulismo alimentare

I sistemi per la prevenzione e il controllo del botulismo alimentare, sia a livello industriale che domestico consistono nella distruzione delle spore eventualmente presenti nelle materie prime, oppure nel controllo della crescita e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. A livello domestico, non essendo possibile effettuare trattamenti termici con vapore surriscaldato e quindi non essendo possibile distruggere le spore eventualmente presenti nelle materie prime, è possibile applicare soltanto le misure atte ad inibire la crescita e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

La temperatura è un parametro di controllo molto importante. I clostridi produttori di tossine botuliniche sono capaci di svilupparsi in un intervallo di temperatura molto ampio (3-38°C), per cui la conservazione degli alimenti al di fuori di questo intervallo costituisce un idoneo sistema di prevenzione e controllo.

La sicurezza delle conserve poco acide ($\text{pH} > 4.6$), il cui pH permette la crescita dei clostridi produttori di tossine botuliniche, è assicurato dal trattamento di sterilizzazione industriale. Per questo genere di prodotti deve essere garantito un livello di sicurezza 12D, cioè deve essere garantita la possibilità di ridurre la popolazione sporale vitale di un fattore 10^{12} (in altri termini, si può tollerare che rimanga contaminata una confezione su 10^{12} confezioni trattate contemporaneamente). Tale livello di sicurezza viene garantito attraverso l'applicazione di un processo termico a 121°C per almeno 3 minuti ($F_0 = 3$). Nella realtà si ricorre ad un trattamento più severo al fine di garantire la riduzione di popolazioni sporali responsabili del deterioramento degli alimenti che hanno resistenze termiche maggiori rispetto a quella di *C. botulinum* tipo A.

Per le conserve acide o acidificate ($\text{pH} < 4.6$) i trattamenti termici applicati sono generalmente più blandi (pastorizzazione – 6D) in quanto questi valori di pH non consentono la germinazione e tossinogenesi delle spore di clostridi produttori di tossine botuliniche. Inoltre, minore è il valore del pH del mezzo minore risulterà la resistenza al calore delle spore. Tale trattamento termico viene effettuato al fine di eliminare quelle popolazioni microbiche che, sviluppatesi a tali valori di pH, potrebbero determinare variazioni del pH fino a valori compatibili con la germinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

Marmellate e confetture di frutta sono generalmente acide, ma il controllo del rischio botulismo in questo genere di prodotti viene assicurato dagli alti contenuti di zucchero che consentono di controllare i valori di water activity, mantenendoli al di sotto di 0.93.

I prodotti in salamoia sono generalmente considerati sicuri purché la concentrazione di cloruro di sodio della salamoia stessa sia almeno del 10%. Tale concentrazione di sale permette di controllare la water activity, mantenendola a valori minori di 0.93. Nel caso delle olive in salamoia, per esempio, il livello di sale seleziona microrganismi alofili capaci di fermentare il prodotto acidificandolo fino al raggiungimento di un pH capace di inibire lo sviluppo dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

Negli ultimi anni è cresciuta fortemente la domanda di prodotti che subiscono blandi trattamenti termici e sono privi o quasi di conservanti come i REPFED. Per questo tipo di prodotti il controllo del rischio botulismo viene effettuato attraverso una combinazione di diversi fattori, come un trattamento di pastorizzazione, l'aggiunta di minimi quantitativi di additivi o conservanti (generalmente i sorbati) e la conservazione per tempi relativamente lunghi (fino a 90 giorni) alla temperatura di refrigerazione. In tutti i casi di botulismo associati al consumo di questa tipologia di prodotti, l'interruzione della catena del freddo è stata identificata come la causa che ha permesso lo sviluppo e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Pertanto la scrupolosa osservazione delle modalità di conservazione riportate nell'etichetta del prodotto costituiscono l'elemento cardine per garantire la sicurezza di questa tipologia di prodotti.

La refrigerazione o il congelamento sono metodi molto efficaci per il controllo del rischio botulismo nei prodotti poco acidi e sottoposti a blandi trattamenti. Il congelamento previene la germinazione delle spore, la crescita e la tossinogenesi. Inoltre esso ha un'azione letale sulle forme vegetative, ma non ha effetto sulla tossina e sulle spore. La refrigerazione può costituire un rischio per il botulismo dal momento che i ceppi non proteolitici sono in grado di crescere fino a temperature di 3.3 °C.

Altri metodi di controllo prevedono l'uso di additivi quali ad esempio i nitriti e i nitrati, il sorbato di potassio, l'acido ascorbico, il lattato di sodio e la nisina.

4.4 Conduzione dell'indagine epidemiologica

Immediatamente dopo la diagnosi clinica il medico che ha posto il sospetto diagnostico deve notificare il caso al Dipartimento di prevenzione della ASL territorialmente competente (rispetto all'ospedale) affinché sia disposta l'immediata attivazione dell'indagine epidemiologica. Lo scopo di tale indagine è quello di:

- identificare la causa, i fattori di rischio e la fonte dell'intossicazione
- organizzare gli interventi di sanità pubblica atti a prevenire ulteriori casi

Contemporaneamente all'inchiesta epidemiologica dovrebbero essere condotte le indagini ambientali, sugli alimenti e le analisi per la conferma di laboratorio.

4.4.1 *Il team di indagine*

L'indagine epidemiologica, soprattutto nei focolai di botulismo in cui si sospetta il coinvolgimento di prodotti industriali, richiede competenze multidisciplinari nei settori della medicina, epidemiologica, diagnosi di laboratorio, microbiologia e chimica degli alimenti, sicurezza alimentare e valutazione del rischio. Poiché il personale coinvolto in questa attività generalmente afferisce a diverse unità operative o addirittura a diverse strutture e Autorità competenti, è fondamentale la cooperazione e il coordinamento di tutti gli attori. A prescindere dall'organizzazione interna, ogni Dipartimento di Prevenzione dovrebbe avere una procedura che disciplini le competenze e l'organizzazione di un team multidisciplinare di pronto intervento. Il gruppo di lavoro tuttavia non può e non deve essere chiuso, infatti, in funzione delle caratteristiche dell'incidente che deve essere investigato, potrebbe essere necessario includere ulteriori specifiche professionalità. Nel team è di fondamentale importanza il ruolo del coordinatore che dovrà essere in grado pianificare le attività di tutti i componenti del team stesso, coordinarsi con eventuali altre strutture coinvolte nella gestione dell'incidente e produrre i report e le relazioni destinate alle Autorità competenti regionali e centrali.

4.4.2 *Le fasi*

Il primo passo dell'indagine epidemiologica ha lo scopo di identificare tutti i casi e di reperire quante più informazioni possibili. Questa prima fase è conseguente la segnalazione ricevuta dal medico che ha posto il sospetto diagnostico e riveste un'importanza cruciale. In questa fase è più probabile che il malato e/o i familiari ricordino la storia alimentare relativa ai giorni precedenti l'insorgenza dei sintomi ed eventuali commensali, pertanto le probabilità di identificare il veicolo alimentare e la lista di tutti gli eventuali esposti è più alta. Nella ricostruzione della storia alimentare del malato è necessario prestare attenzione fino a 8 giorni prima della comparsa dei primi segni clinici/sintomi. Nel caso in cui si accerti che la sintomatologia neurologica è stata preceduta da quella gastroenterica, è consigliabile riferirsi a questa ultima come tempo zero per calcolare i 8 giorni. In questa fase i campioni clinici relativi al malato dovrebbero già essere stati raccolti ed inviati al laboratorio per la conferma del sospetto clinico.

Nella seconda fase dell'inchiesta epidemiologica si procede con l'analisi dei sintomi e segni clinici raccolti analizzandone la tipologia e la frequenza di comparsa dopo i pasti sospetti. In caso di focolaio, attraverso la costruzione della curva epidemica è possibile stimare il periodo dell'esposizione all'alimento incriminato e il luogo in cui l'alimento è stato consumato, qualora non fosse evidente un momento e un luogo unico di esposizione. La corretta conduzione di questa fase permette, mediante l'analisi statistica dei dati raccolti, di valutare la probabilità di rischio correlata ad ogni alimento/ingrediente consumato dai commensali. Combinando i dati di probabilità ottenuti per ogni alimento/ingrediente con le caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti stessi, sarà possibile circoscrivere il numero delle analisi di laboratorio necessarie per l'identificazione dell'alimento veicolo dell'intossicazione. In questa fase dovrà essere disposta una visita ispettiva presso il luogo sospetto dell'esposizione al fine di campionare i residui alimentari consumati dal malato ed eventualmente le confezioni gemelle (in caso di prodotti industriali stesso lotto di

produzione di quello sospettato di essere il veicolo dell'intossicazione). Qualora l'alimento/ingrediente emerso come plausibilmente il più probabile veicolo dell'intossicazione fosse di produzione industriale, in questa fase dovrebbero essere disposte le misure di controllo ufficiale sugli OSA stabilite dalla vigente normativa.

Sulla base dei sintomi e dei segni clinici registrati, del luogo e del tempo di esposizione sarà possibile elaborare la definizione di caso che dovrà prevedere la differenziazione fra caso confermato e probabile. La definizione di caso deve essere semplice, esplicita, oggettiva ed utilizzabile sul campo. Si dovrebbe evitare l'utilizzo di termini generici come "malessere". Nell'elaborazione della definizione di caso si dovrà tenere conto dei concetti di sensibilità e specificità. Una definizione sensibile è quella che identifica gran parte o tutti i casi di malattia, mentre una definizione specifica è quella che evita che persone non malate vengano erroneamente incluse fra i casi. L'adozione di una definizione troppo sensibile genera falsi positivi, mentre una definizione troppo specifica potrebbe sottostimare il rischio associato con una data esposizione, diminuendo così la probabilità di identificare un'associazione statisticamente significativa.

Da quanto emerso nelle fasi precedenti è possibile sviluppare un'ipotesi descrittiva dell'incidente. A tal fine le informazioni e i dati epidemiologici devono essere combinati con le indagini ambientali e sugli alimenti/ingredienti. Questa fase dell'indagine epidemiologica è particolarmente importante, infatti, in caso di mancato isolamento dell'agente eziologico dall'alimento/ingrediente bisogna verificare se l'ipotesi generata dallo studio epidemiologico ha una sua plausibilità. Occorre verificare cioè se l'alimento/ingrediente, le sue modalità di preparazione, conservazione e consumo siano state tali da giustificare la contaminazione e la conseguente malattia. In caso di isolamento dell'agente eziologico dall'alimento epidemiologicamente sospettato, occorre comunque identificare tutti i fattori che possono aver contribuito al verificarsi dell'incidente. La credibilità di un'ipotesi può essere valutata sulla base dello studio descrittivo e delle indagini di laboratorio o attraverso l'esecuzione di uno studio analitico *ad hoc*. Gli studi di tipo analitico solitamente prevedono l'uso di un gruppo di confronto che permette di determinare la forza dell'associazione tra l'esposizione e la malattia. Le tipologie di studi analitici più frequentemente utilizzati nelle indagini di focolai sono gli studi di coorte e gli studi caso-controllo. Gli studi di coorte si applicano in caso di focolai in cui è coinvolta una piccola e ben definita popolazione ed in cui siano chiaramente identificabili gli esposti e i non esposti. In questo tipo di studi analitici il rischio di contrarre l'intossicazione consumando un determinato alimento/ingrediente è dato dal valore del rischio relativo che è il rapporto tra il tasso d'attacco specifico per l'alimento degli esposti e quello dei non esposti. Nei casi in cui non è possibile ricostruire tutta la coorte ma è stato possibile identificare tutti i casi, il confronto si può fare con un gruppo di controllo. La popolazione di controllo non deve essere malata e deve essere rappresentativa della popolazione da cui provengono i casi. Nel caso dei focolai di botulismo, che generalmente coinvolgono piccoli gruppi familiari, per ogni caso dovrebbero essere utilizzati 3, 4 controlli. Se invece il focolaio fosse più esteso (50 o più casi) è sufficiente un numero di controlli pari a quello dei casi. Negli studi caso-controllo si calcola l'Odds ratio (OR) come rapporto tra la probabilità di contrarre

l'intossicazione consumando un certo alimento/ingrediente nella popolazione esposta e a probabilità di contrarre l'intossicazione consumando un certo alimento/ingrediente nella popolazione non esposta.

4.4.3 Indagini ambientali e sugli alimenti/ingredienti

Contemporaneamente alle indagini di tipo epidemiologico, devono essere condotte indagini ambientali mirate ad individuare il luogo in cui l'alimento/ingrediente è stato contaminato, individuare i fattori e i comportamenti che non hanno permesso l'idoneo controllo del rischio botulismo e identificare ed implementare interventi correttivi.

Nel caso in cui il prodotto alimentare/ingrediente sia di produzione industriale le attività di controllo ufficiale condotte dall'Autorità competente dovranno accertare la conformità ai regolamenti comunitari del pacchetto igiene mediante:

- valutazione del processo produttivo anche mediante analisi della documentazione pertinente e delle relative registrazioni;
- valutazione delle attività di autocontrollo poste in essere dall'azienda;
- valutazione delle procedure di rintracciabilità in ingresso e in uscita dell'alimento/ingrediente;
- presa visione dei rapporti di controllo ufficiale routinario dell'impianto produttivo;
- valutazione delle condizioni igienico-sanitarie generali degli stabilimenti.

Sarà inoltre necessario effettuare gli accertamenti analitici sui campioni alimentari appartenenti allo stesso lotto di produzione di quelli identificati come potenziali responsabili dell'intossicazione (vedi § relativo al campionamento). In presenza di un esito analitico che evidenzi la presenza di tossine botuliniche o di clostridi produttori di tossine botuliniche, andrà attivato il sistema di allerta (Rapid Alert System for Food and Feed-RASFF) inviando per e-mail la scheda di notifica del sospetto caso, comprensiva delle indagini epidemiologiche condotte e dei rapporti di prova delle analisi, al Punto di Contatto Nazionale del Sistema di Allerta (dav.allerta@sanita.it).

Le indagini condotte sugli alimenti sospetti di essere il veicolo dell'intossicazione devono prevedere la valutazione della storia completa del processo di preparazione senza tralasciare:

- l'origine degli ingredienti;
- il personale addetto alle fasi di lavorazione e manipolazione e conservazione;
- le procedure e le attrezzature utilizzate nella preparazione, manipolazione e conservazione;

- le potenziali fonti di contaminazione.

Qualora l'incidente di botulismo sia correlato al consumo di pasti erogati da esercizi di ristorazione commerciale, l'ispezione, da condurre tempestivamente, dovrà mettere in evidenza, oltre alle condizioni igienico-sanitarie e di gestione dell'attività, le modalità di preparazione dell'alimento sospetto. In particolare sarà necessario:

- raccogliere le liste delle vivande (menù), le ricette e tutte le informazioni sul prodotto preparato;
- accertare, su ingredienti e materie prime utilizzate, l'origine, le modalità di trasporto, conservazione/stoccaggio/scongelo/cottura e manipolazione;
- individuare le possibili fonti e vie di contaminazione alle quali gli alimenti potrebbero essere stati esposti, verificando le persone che li hanno manipolati, le procedure e attrezzature usate;
- verificare l'autorizzazione sanitaria/registrazione dell'OSA;
- verificare il manuale di autocontrollo e relative registrazioni;
- trasmettere copia di tutta la documentazione acquisita via posta elettronica al Punto di Contatto Regionale, al Punto di Contatto Nazionale del RASFF (dav.allerta@sanita.it) e al Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (cnr.botulismo@iss.it);

4.4.4 Comunicazione con le altre Autorità competenti coinvolte e report finale

Il costante scambio di informazioni con tutti gli attori coinvolti nella gestione dell'incidente è fondamentale al fine di attuare in tempo reale tutte le misure di tutela della salute pubblica. Nel caso in cui siano coinvolti prodotti di produzione industriale è necessario almeno che il team di indagine e il laboratorio comunichino in tempo reale al Punto di Contatto Nazionale del RASFF del Ministero della Salute (dav.allerta@sanita.it) gli stati di avanzamento delle loro attività.

A conclusione delle attività deve essere effettuata una relazione finale sull'incidente. Tale relazione deve contenere una sintesi cronologica di tutte le attività svolte, una valutazione dell'efficacia delle attività svolte, la descrizione delle misure di controllo prese e le raccomandazioni sulle azioni future. Tale relazione prima di essere resa definitiva dovrebbe essere condivisa fra tutti gli attori e le Autorità competenti che hanno preso parte alla gestione dell'incidente.

4.5 Attivazione del RASFF

Qualora l'esito delle analisi condotte sugli alimenti di produzione industriale evidenzia la presenza di tossine botuliniche o di clostridi produttori di tossine botuliniche sarà necessario attivare il sistema di allerta RASFF.

Come precedentemente indicato, il riscontro delle spore di clostridi produttori di tossine botuliniche in campioni di miele, non comporta l'attivazione del RASFF.

Con l'attivazione del RASFF sarà necessario accertare quanto segue:

- se il lotto/prodotto segnalato è stato distribuito in altri Paesi dell'UE o in Paesi extraeuropei, fornendo al Punto di Contatto nazionale del RASFF la relativa lista di commercializzazione. Qualora tale lista non fosse disponibile, dovrà essere tempestivamente acquisita e trasmessa tramite posta elettronica (dav.allerta@sanita.it);
- quali provvedimenti cautelativi siano stati adottati in merito alla commercializzazione del lotto/prodotto segnalato. Gli Assessorati alla Sanità delle Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano dovranno trasmettere direttamente alle altre Regioni eventualmente interessate, la lista di commercializzazione del prodotto in ambito nazionale, per l'adozione dei provvedimenti di competenza. È inoltre necessario che gli Assessorati alla Sanità delle Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano inseriscano prontamente le informazioni disponibili sui dati commerciali e sulla tracciabilità del prodotto, attraverso la piattaforma I-RASFF per consentire i successivi follow-up da parte gli Assessorati alla Sanità delle Regioni e Province autonome. Sarà cura del Punto di Contatto Nazionale del RASFF inviare le notifiche attraverso la piattaforma I-RASFF alla Commissione europea nel caso che l'alimento sia stato distribuito all'estero o sia di origine extra nazionale.
- Il processo produttivo attraverso una verifica ispettiva presso lo stabilimento di produzione con particolare attenzioni ai processi/trattamenti utilizzati per il contenimento del rischio botulismo – sterilizzazione, pastorizzazione, acidificazione e all'autocontrollo. Dovrà essere valutato il manuale HACCP, la sua corretta applicazione e, se possibile, ne dovrà essere acquisita una copia. Sarà altresì necessario acquisire: le registrazioni relative ai processi effettuati nel periodo di produzione dell'alimento sospetto, le schede tecniche del prodotto, i rapporti di prova delle analisi eseguite in autocontrollo e la registrazione di eventuali non conformità registrate in precedenti controlli ufficiali. Nel caso in cui altri alimenti siano stati prodotti sulla stessa linea di produzione, l'ASL dovrà individuare quali altri lotti/prodotti siano da considerare a rischio e quali provvedimenti siano stati adottati a tutela della salute pubblica.

Sarà inoltre necessario:

- trasmettere copia di tutta la documentazione acquisita via posta elettronica al Punto di Contatto Regionale, al Punto di Contatto Nazionale del RASFF (dav.allerta@sanita.it) e al Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (cnr.botulismo@iss.it);
- verificare l'avvenuto ritiro e richiamo del prodotto secondo le modalità descritte nella nota ministeriale del 15 dicembre 2016, protocollo DGISAN-47556, diramata agli Assessorati delle

Regioni e Province Autonome di Trento e Bolzano. Per quanto riguarda il richiamo, il comunicato dell'Operatore del Settore Alimentare dovrà essere pubblicato anche nel portale del Ministero della Salute.

- Al termine delle indagini dovrà essere trasmessa al Punto di Contatto Nazionale del RASFF (dav.allerta@sanita.it) la relazione conclusiva.

Al fine di garantire le comunicazioni rapide in casi di emergenza, gli Assessorati alla Sanità delle Regioni e Province autonome di Trento e Bolzano, periodicamente, o in caso di variazioni, aggiornano la lista dei punti di Contatto Regionali e Locali comprensivi dei recapiti telefonici e del cellulare di servizio da utilizzarsi in casi di allerta in orari extra lavorativi o in giorni festivi e la trasmettono al Punto di Contatto Nazionale del RASFF (dav.allerta@sanita.it).

Appendice 1

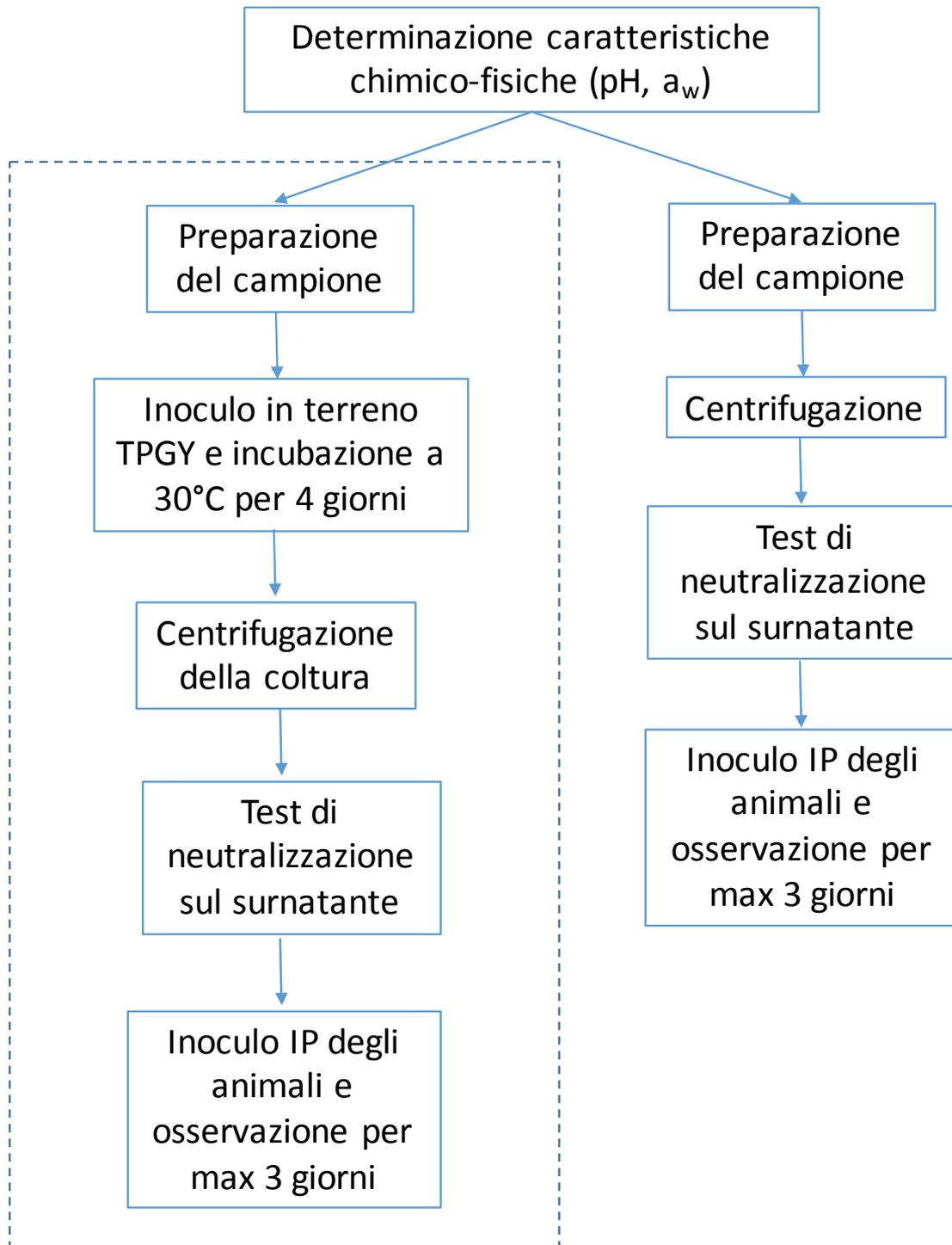
Figura n.1

DIAGRAMMA DI FLUSSO DEL METODO PER LA DETERMINAZIONE DEI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MULTIPLEX REAL-TIME PCR



Figura n.2

DIAGRAMMA DI FLUSSO DEL METODO PER LA DETERMINAZIONE DELLE TOSSINE BOTULINICHE E DEI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE MEDIANTE MOUSE BIOASSAY

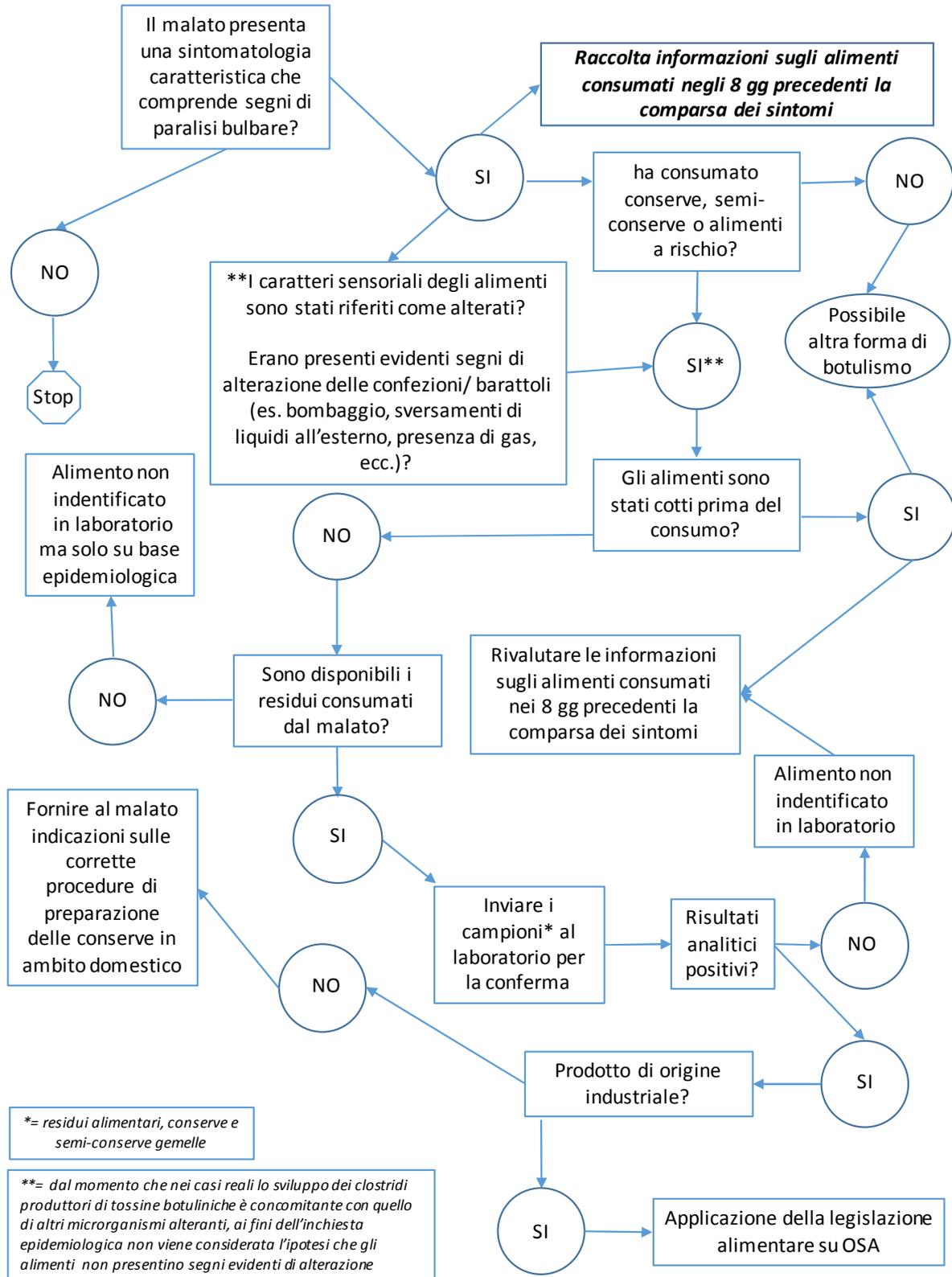


Questa parte può essere sostituita con il metodo della figura 1.

Appendice 2

Figura n. 3.

Albero delle decisioni - Inchiesta epidemiologica



Appendice 3

Figura n. 4.

Diagramma di flusso - campionamento ed analisi degli alimenti sospettati di essere il veicolo dell'intossicazione

Configurandosi il botulismo come una grave minaccia per la salute pubblica è necessario procedere all'effettuazione delle analisi sui campioni pervenuti in laboratorio senza indugio.

