



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)</b>	REV. 1
--------------	---	--------

Rev.	In vigore il: RAQ-AC	Redazione PT-AC-CRB	Verifica RSA-AC-CRB	Approvazione DR-AC
0	G. Ciccaglioni 20.05.2011	F. Anniballi	L. Fenicia	L. Croci
1	31.07.2013 			

Descrizione delle modifiche:	Correzione dei refusi nell' intero documento. Cap. 1: integrazione dello scopo e del campo di applicazione del metodo; Cap. 3 integrazione delle definizioni ai paragrafi 3.1, 3.2, 3.3, 3.7; Cap. 4 inserimento personale TPM 3-PM; Cap. 8 integrazione materiali e reagenti; Cap. 9 integrazione materiali di riferimento; Cap. 10 inserimento paragrafi 10.5 e 10.6 relativi ai terreni di coltura botulismo animale; integrazione dei capp. 12, 13, 14 relativamente all' analisi dei campioni di botulismo animale; Cap.18 integrazione destinatari.
---------------------------------	---

Copia controllata n° 1

Copia non controllata



**DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE**

**REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA**

**POMIAC02.001**

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)**

**REV. 1**

**INDICE**

<b>1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b>	<b>4</b>
<b>2. RIFERIMENTI</b>	<b>4</b>
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI</b>	<b>5</b>
3.1 Clostridi produttori di tossine botuliniche	5
3.2 Clostridium botulinum	5
3.3 Tossine botuliniche	6
3.4 Antitossine botuliniche	6
3.5 Botulismo	6
3.6 Campioni biologici	7
3.7 Alimenti acidi o acidificati	7
3.8 Mouse test	7
<b>4. ABBREVIAZIONI</b>	<b>7</b>
<b>5. RESPONSABILITÀ</b>	<b>8</b>
<b>6. NORME DI IGIENE E SICUREZZA</b>	<b>8</b>
<b>7. APPARECCHIATURE</b>	<b>8</b>
<b>8. MATERIALI</b>	<b>9</b>
<b>9. MATERIALI DI RIFERIMENTO</b>	<b>9</b>
<b>10. PREPARAZIONE TERRENI E REAGENTI</b>	<b>10</b>
10.1 Triptone Peptone Glucose Yeast extract broth (TPGY)	10
10.1.1 Composizione del terreno	10
10.1.2 Preparazione	10
10.2 Triptone Peptone Glucose Yeast extract broth tamponato (TPGY tamponato)	10
10.2.1 Composizione della base	10
10.2.2 Composizione del tampone	10
10.2.3 Preparazione del TPGY tamponato	11
10.3 Egg Yolk Agar (EYA)	11
10.3.1 Composizione del terreno	11
10.3.2 Preparazione	11
10.4 Tampone Fosfato Gelatina	11
10.4.1 Composizione del Tampone Fosfato Gelatina	11
10.4.2 Preparazione	11
10.5 Cooked Meat Fortificato (CMF)	12
10.5.1 Composizione del terreno	12



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)</b>	<b>REV. 1</b>
--------------	---	---------------

10.5.2 Preparazione	12
10.6 McClung Toabe Medium (MCTM)	12
10.6.1 Composizione del terreno	12
10.6.2 Preparazione	12
<b>11. REQUISITI E MODALITÀ DI MANIPOLAZIONE/CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI</b>	<b>13</b>
<b>12. PRINCIPIO DEL METODO</b>	<b>13</b>
12.1 Ricerca delle tossine botuliniche	13
12.2 Ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche	13
<b>13. DESCRIZIONE DEL PROCEDIMENTO</b>	<b>14</b>
13.1 Tipologia di campione da sottoporre ad analisi	14
13.2 Ricerca e tipizzazione delle tossine botuliniche	14
13.2.1 Protocollo del Mouse Test	14
13.2.2 Ricerca e tipizzazione delle tossine botuliniche nei campioni di siero	15
13.2.3 Ricerca e tipizzazione delle tossine in campioni liquidi (alimenti ed estratti) e/o contenenti una fase acquosa	16
13.2.4 Ricerca e tipizzazione delle tossine botuliniche in campioni solidi (alimenti, feci, tessuti, organi interni) e/o contenenti una fase oleosa	18
13.3 Ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche	18
13.3.1 Preparazione del campione e allestimento delle colture di arricchimento	18
13.3.2 Ricerca e tipizzazione delle tossine botuliniche nelle colture di arricchimento	21
13.4 Isolamento di colonie pure di clostridi produttori di tossine botuliniche – parte opzionale	21
13.4.2 Conferma della tossicità delle colonie tipiche	22
13.4.3 Tipizzazione delle tossine botuliniche delle colonie singole	22
<b>14. CONVALIDA DEI RISULTATI</b>	<b>23</b>
14.1 Ricerca delle tossine botuliniche	23
14.2 Ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche	23
<b>15. ESPRESSIONE DEI RISULTATI</b>	<b>23</b>
<b>16. CONTROLLI DI QUALITÀ</b>	<b>23</b>
<b>17. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA</b>	<b>24</b>
<b>18. DESTINATARI</b>	<b>24</b>
<b>Appendice 1</b>	<b>25</b>



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO COLTURALE E MOUSE TEST)**

REV. 1

## 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo descrive le modalità seguite per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche in campioni alimentari, mangimi, campioni biologici (siero, feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti, organi interni), campioni ambientali e colture di arricchimento. **Tale metodo si applica alla ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche responsabili del botulismo umano ed animale.**

I materiali idonei per la ricerca di tossina botulinica nei focolai di origine alimentare includono il siero, le feci, i lavaggi intestinali, il contenuto gastrico e l'alimento/**mangime** sospetto; nelle infezioni di ferite, prelevare siero, feci, tessuti da tolettatura della ferita.

I materiali idonei per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche sono le feci, i lavaggi intestinali, i tamponi rettali, il contenuto gastrico, l'alimento sospetto e i tessuti da tolettatura della ferita e gli organi interni. A volte anche i campioni ambientali possono essere utili per stabilire la fonte probabile di infezione (es. casi di botulismo infantile, casi di botulismo da ferita in tossicodipendenti, **casi di botulismo animale**).

## 2. RIFERIMENTI

*Per tutti i documenti di seguito elencati si fa riferimento all'ultima revisione.*

*CDC, Botulism Manual – Handbook for Epidemiologists, Clinicians, and Laboratory Workers. Atlanta, GA, Centers for Diseases Control and Prevention, 1998, pp. 15-21.*

*AOAC Official Method 977.26, Clostridium botulinum and its toxins in foods. Bacteriological Analytical Manual online. Chapter 17 Clostridium botulinum. <http://www-cfsan.fda.gov/>*

*ISO 7218 Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche.*

*ISO/UNI 17025 - Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura.*

*UNI ENV ISO 11133-1 "Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Guida per la preparazione e la produzione dei terreni colturali – Guida generale per l'assicurazione della qualità per la preparazione dei terreni colturali in laboratorio.*

*UNI CEN ISO/TS 11133-2 "Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – Guida per la preparazione e la produzione dei terreni colturali - Linee guida pratiche sulle prove di prestazione di terreni colturali.*



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO COLTURALE E MOUSE TEST)**

REV. 1

*PGGDSP01.00n "Gestione della documentazione".*

*PGRMSP01.00n "Redazione metodi di prova".*

*PGGASP01.00n "Gestione delle apparecchiature".*

*PGPAAC01.00n "Gestione campione e registrazione dati analitici".*

*POQMAC01.00n "Controllo di qualità dei metodi microbiologici".*

*IOQTAC01.00n "Controllo di qualità dei terreni di coltura".*

*IOQMAC01.00n "Controllo di qualità dei materiali destinati alla microbiologia".*

*IOSRAC01.00n "Conservazione, rivitalizzazione e standardizzazione dei ceppi batterici".*

### **3. TERMINI E DEFINIZIONI**

Per gli scopi di questo documento, si applicano i seguenti termini e definizioni.

#### **3.1 Clostridi produttori di tossine botuliniche**

Microrganismi anaerobi sporigeni, appartenenti al genere *Clostridium*, in grado di produrre tossine botuliniche in determinate condizioni ambientali. Attualmente fanno parte di questa classe di microrganismi, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum* produttore di tossina botulinica tipo E, *Clostridium baratii* produttore di tossina botulinica tipo F.

**I ceppi produttori di tossine botuliniche tipo A, B, E, F sono principalmente correlati al botulismo umano. I ceppi produttori di tossine tipo C e D sono correlati al botulismo animale. *C. botulinum* tipo G è stato associato al momento soltanto ad un caso di botulismo da ferita nell'uomo.**

#### **3.2 *Clostridium botulinum***

Batterio anaerobio sporigeno con spora in posizione sub-terminale rispetto al corpo bastoncellare che in determinate condizioni ambientali è in grado di produrre tossine botuliniche tipo A, B, C, D, E, F, G.

**I ceppi di *C. botulinum* tipo C e D responsabili del botulismo animale hanno esigenze di anaerobiosi più stringenti rispetto ai ceppi responsabili del botulismo umano (tipo A, B, E, F e G), per cui per una loro coltivabilità ideale è necessario pre-ridurre i terreni colturali lasciandoli in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni prima dell'utilizzo.**



POMIAC02.001

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO COLTURALE E MOUSE TEST)**

REV. 1

### 3.3 Tossine botuliniche

Proteine termolabili, solubili in fase acquosa, in grado di provocare la sindrome neuroparalitica del botulismo nell'uomo e in molte specie animali. Attualmente sono state identificate 7 varianti antigeniche di tossine botuliniche che vengono classificate con le lettere dell'alfabeto dalla A alla G. Sono responsabili del botulismo umano le tossine tipo A, B, E, F. Le tossine tipo C e D sono generalmente associate al botulismo animale. La tossina tipo G è stata al momento associata soltanto ad un caso di botulismo da ferita. Per quanto riguarda il botulismo animale è stata osservata una certa correlazione fra specie animale e tipo di tossina. Nei bovini la maggior parte dei focolai è correlata alla tossina tipo D, anche se sono riportati in letteratura focolai dovuti alle tossine tipo B, C, A. Nei cavalli la tossina più frequentemente responsabile del botulismo è la tipo B. Negli uccelli e negli animali da pelliccia è più frequente il rinvenimento di tossina tipo C. Nei pesci e in alcune di uccelli che si cibano di pesce si ritrova tossina tipo E.

I geni codificanti per le tossine botuliniche tipo C e tipo D, sono veicolati da batteriofagi lisogenici, che facilmente possono essere persi durante le procedure di laboratorio rendendo i microrganismi non tossigeni. Le tossine espresse da questi geni fagici possono ricombinare tra loro e determinare i cosiddetti mosaici. Il mosaico tipo CD è costituito da 2/3 di tossina tipo C e 1/3 di tossina tipo D; il mosaico tipo DC è costituito da 2/3 di tossina tipo D e 1/3 di tossina tipo C. I mosaici sembrano esercitare una tossicità maggiore rispetto alle loro varianti non mosaico.

### 3.4 Antitossine botuliniche

Anticorpi specifici per la neutralizzazione delle tossine botuliniche. Per gli scopi di cui alla presente procedura operativa si distinguono antitossina trivalente e antitossine monovalenti. L'antitossina trivalente è una soluzione che contiene anticorpi in grado di neutralizzare le tossine botuliniche tipo A, tipo B, tipo E. Le antitossine monovalenti sono soluzioni in grado di neutralizzare un solo tipo di tossina botulinica. Per gli scopi di cui alla presente procedura sono utilizzate 7 tipi di antitossine monovalenti in grado di neutralizzare rispettivamente le tossine botuliniche tipo A, tipo B, tipo C, tipo D, tipo E, tipo F e tipo G.

### 3.5 Botulismo

Sindrome neuroparalitica causata dall'azione delle tossine botuliniche. Si manifesta come una paralisi flaccida, simmetrica, discendente, che può colpire l'uomo e molte specie animali. Sono state identificate diverse forme :

- botulismo alimentare, provocato dall'ingestione di tossine botuliniche preformate negli alimenti;
- botulismo infantile, provocato dalle tossine botuliniche prodotte *in situ* dai clostridi produttori di tossine botuliniche che in determinate condizioni possono colonizzare temporaneamente il tratto intestinale di lattanti con età inferiore ad un anno;



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)</b>	REV. 1
--------------	---	--------

- botulismo intestinale dell'adulto, si presenta in adulti e ragazzi con le stesse caratteristiche del botulismo infantile;
- botulismo da ferita, provocato dalla infezione di una ferita da parte di *Clostridium botulinum*;
- botulismo iatrogeno, provocato dall'erroneo utilizzo delle tossine botuliniche per scopi terapeutici o cosmetici.

**Il botulismo alimentare e quello da ferita sono comuni sia all'uomo che agli animali. In alcune specie animali sono state identificate forme tossinfezive che presentano lo stesso meccanismo patogenetico del botulismo infantile e da colonizzazione intestinale dell'adulto.**

### 3.6 Campioni biologici

I campioni biologici da analizzare in caso di botulismo possono differire a seconda della forma della malattia e dello stato del paziente. Generalmente si analizzano siero, feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti, organi interni.

### 3.7 Alimenti acidi o acidificati

Gli alimenti acidi sono tutti quegli alimenti che naturalmente hanno un valore di pH minore di 4.6. Sono invece definiti alimenti acidificati tutti quegli alimenti che vengono acidificati per aggiunta di sostanze acide (aceto, correttori di acidità) fino al raggiungimento di un pH minore o uguale ai 4.6.

**Gli insilati per uso zootecnico sono generalmente acidificati.**

### 3.8 Mouse test

Il mouse test rappresenta il metodo "gold standard" per la ricerca delle tossine botuliniche. Si effettua su topini da laboratorio mediante incolo intraperitoneale del campione tal quale o estratto e della brodocoltura da testare.

## 4. ABBREVIAZIONI

AC	Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica
CRB	Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo
DD	Direttore del Dipartimento
DR	Direttore di Reparto
PO	Procedura Operativa
PT-AC-CRB	Personale Tecnico del Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo
RAQ	Responsabile Assicurazione Qualità
RSA-AC-CRB	Responsabile Settore Analitico Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo
SP	Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
TPM-1-PM	Personale Tecnico del Reparto Pericoli Microbiologici Connessi agli
TPM-3-PM	Alimenti



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)

REV. 1

## 5. RESPONSABILITÀ

Il personale tecnico abilitato all'esecuzione del metodo di prova per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche e per la ricerca di tossine botuliniche mediante metodo colturale e mouse test, è responsabile dell'esecuzione materiale delle prove.

Le registrazioni sul foglio di lavoro, le registrazioni dei dati grezzi, delle osservazioni e dei risultati sono responsabilità del personale tecnico incaricato delle analisi e vengono effettuate in accordo alle prescrizioni della PGPAAC01.00n.

Il RSA-AC-CRB è responsabile della verifica dell'intero procedimento analitico, dei risultati analitici ottenuti, della verifica della loro corretta trascrizione nel rapporto di prova conformemente a quanto indicato nella PGPAAC01.00n.

È responsabilità del Servizio Biologico e per al Gestione della Sperimentazione Animale dell'ISS, la fornitura e la gestione degli animali stabulati.

## 6. NORME DI IGIENE E SICUREZZA

Le norme di igiene e sicurezza di seguito riportate, sono quelle espresse nel "CDC botulism manual". L'agente eziologico di tutte le forme di botulismo è la tossina botulinica. Minime quantità di tossine assunte 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.

*C. botulinum* appartiene alla classe di rischio II ed agisce attraverso la produzione di tossine. Tutte le operazioni relative ai passaggi colturali sono pertanto svolte indossando obbligatoriamente il camice, i guanti ed eventualmente occhiali di protezione o visiera. E' necessario da parte dell'operatore 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 uso presso il laboratorio. In caso di sversamento di materiale sospettato di contenere tossina botulinica, questa può essere neutralizzata usando una soluzione 1M di idrossido di sodio. I clostridi produttori di tossine botuliniche vengono neutralizzati da una soluzione 1:10 di ipoclorito di sodio per un tempo di contatto di 15-20 minuti o altro idoneo disinfettante. Se il materiale sgocciolato contiene sia il microrganismo che la tossina si devono usare in sequenza sia l'ipoclorito di sodio che l'idrossido di sodio.

## 7. APPARECCHIATURE

- 7.1 Anse sterili;
- 7.2 Autoclave in grado di raggiungere la temperatura di 121°C;
- 7.3 Bagnomaria a 70°C ±1°C;
- 7.4 Buste sterili per stomacher a battuta;
- 7.5 Centrifuga in grado di raggiungere almeno 12000 x g;



POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)</b>	REV. 1
--------------	---	--------

- 7.6 Congelatore a  $T < -18^{\circ}\text{C}$ ;
- 7.7 Filtri a siringa tipo Millipore  $0.45\ \mu\text{m}$ ;
- 7.8 Frigoriferi  $+3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ;
- 7.9 Giare per anaerobiosi o idoneo apparato per l'incubazione in condizioni di anaerobiosi;
- 7.10 Igrometro per la misura dell'activity water;
- 7.11 Incubatore a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;
- 7.12 Incubatore a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;
- 7.13 Microscopio ottico con obiettivo per immersione 100x e oculari 10x;
- 7.14 pH metro;
- 7.15 Piastre di Petri con diametro di 90 mm;
- 7.16 Pipette graduate;
- 7.17 Provette da batteriologia;
- 7.18 Provette con tappo a vite o a scatto;
- 7.19 Siringhe da 1 ml con aghi tipo insulina;
- 7.20 Stomacher a battuta.

## 8. MATERIALI

Tutti i reagenti sono da intendersi del grado di purezza PA.

- 8.1 Acqua distillata;
- 8.3 Agar batteriologico;
- 8.4 Alcol etilico assoluto;
- 8.5 Alcol etilico denaturato;
- 8.6 Cloruro di sodio;
- 8.7 Diidrogeno fosfato di sodio;
- 8.8 Egg yolk emulsion;
- 8.9 Estratto di lievito;
- 8.10 Gelatina;
- 8.11 Glucosio;
- 8.12 Idrogeno fosfato di sodio;
- 8.13 Peptone;
- 8.14 Triptone;
- 8.15 Cooked meat medium;
- 8.16 Carbonato di calcio;
- 8.17 Solfato di ammonio;
- 8.18 Amido solubile;
- 8.19 Cisteina;
- 8.20 Solfato di magnesio;

## 9. MATERIALI DI RIFERIMENTO

Per gli scopi di cui alla presente PO si utilizzano i seguenti materiali di riferimento:

- Antitossina botulinica trivalente (anti-A, anti-B, Anti-E)



POMIAC02.001

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)

REV. 1

- **Antitossina polivalente (anti-A, anti-B, anti-C, anti-D, anti-E, anti-F, anti-G)**
- Antitossina botulinica anti-A
- Antitossina botulinica anti-B
- **Antitossina botulinica anti-C**
- **Antitossina botulinica anti-D**
- Antitossina botulinica anti-E
- Antitossina botulinica anti-F
- **Antitossina botulinica anti-G**

## 10. PREPARAZIONE TERRENI E REAGENTI

### 10.1 *Tryptone Peptone Glucose Yeast extract broth (TPGY)*

#### 10.1.1 Composizione del terreno

Tryptone	g 50
Peptone	g 5
Estratto di lievito	g 20
Glucosio	g 4
Acqua distillata	ml 1000

#### 10.1.2 Preparazione

Dissolvere in idoneo contenitore di vetro tipo Pirex gli ingredienti usando acqua distillata. Se necessario, aliquotare 9 ml di terreno in provette per batteriologia. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. pH finale del terreno 7.0 ± 0.2. Conservare il terreno sterilizzato in frigorifero a + 5°C ± 3°C per non oltre 4 settimane.

### 10.2 *Tryptone Peptone Glucose Yeast extract broth tamponato (TPGY tamponato)*

#### 10.2.1 Composizione della base

Tryptone	g 50
Peptone	g 5
Estratto di lievito	g 20
Glucosio	g 4

#### 10.2.2 Composizione del tampone

10.2.2.1 Soluzione A. Dissolvere 138 g di diidrogeno fosfato di sodio (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) in 1000 ml di acqua distillata.

10.2.2.2 Soluzione B. Dissolvere 142 g di idrogenofosfato di sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in 1000 ml di acqua distillata.



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)**

REV. 1

10.2.2.3 Composizione del tampone. A 250 ml della soluzione A, aggiungere goccia a goccia la soluzione B finché il pH finale del tampone non raggiunga il valore di  $7.2 \pm 0.2$ .

### 10.2.3 Preparazione del TPGY tamponato

Dissolvere, in idoneo contenitore di vetro tipo Pirex, i componenti della base in 500 ml di acqua distillata. Aggiungere 100 ml del tampone di cui al punto 7.2.2.3, quindi portare al volume finale di un litro aggiungendo acqua distillata. Sterilizzare in autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti. pH finale del terreno  $7.2 \pm 0.2$ . Conservare il terreno sterilizzato in frigorifero a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  per non oltre 4 settimane.

## 10.3 Egg Yolk Agar (EYA)

### 10.3.1 Composizione del terreno

Triptone	g 5
Peptone	g 20
Estratto di lievito	g 5
NaCl	g 5
Agar batteriologico	g 20
Acqua distillata	ml 1000
Egg yolk emulsion	ml 80

### 10.3.2 Preparazione

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata. Sterilizzare il terreno in autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti. Raffreddare il terreno alla temperatura di  $45-50^{\circ}\text{C}$ . Aggiungere sterilmente 80 ml di Egg yolk emulsion, quindi distribuire in piastre di Petri sterili. pH finale del terreno  $7.0 \pm 0.2$ . Conservare le piastre in frigorifero a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  per non oltre 4 settimane.

## 10.4 Tampone Fosfato Gelatina

### 10.4.1 Composizione del Tampone Fosfato Gelatina

Gelatina	g 2
Idrogeno fosfato di sodio	g 4
Acqua distillata	ml 1000

### 10.4.2 Preparazione

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata. Sterilizzare il tampone in autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti. pH finale  $6.2 \pm 0.2$ . Conservare il tampone in frigorifero a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  per non oltre 4 settimane.



POMIAC02.001

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO COLTURALE E MOUSE TEST)

REV. 1

### 10.5 Cooked Meat Fortificato (CMF)

#### 10.5.1 Composizione del terreno

<u>Cooked Meat Medium</u>	<u>g 1.25</u>
<u>Amido solubile</u>	<u>g 0.01</u>
<u>Estratto di lievito</u>	<u>g 0.1</u>
<u>Carbonato di calcio</u>	<u>g 0.05</u>
<u>Solfato di ammonio</u>	<u>g 0.1</u>
<u>Glucosio</u>	<u>g 0.08</u>
<u>Cisteina</u>	<u>g 0.01</u>
<u>Acqua distillata</u>	<u>ml 10</u>

#### 10.5.2 Preparazione

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata. Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C per 15 minuti. pH finale 7.6 ± 0.2. Conservare il terreno sterilizzato in frigorifero a + 5°C ± 3°C per non oltre 4 settimane.

Prima dell'uso è preferibile mantenere il terreno in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.

### 10.6 McClung Toabe Medium (MCTM)

#### 10.6.1 Composizione del terreno

<u>Triptone</u>	<u>g 40</u>
<u>Estratto di lievito</u>	<u>g 5.0</u>
<u>Agar batteriologico</u>	<u>g 20.0</u>
<u>Cloruro di sodio</u>	<u>g 2.0</u>
<u>Glucosio</u>	<u>g 2.0</u>
<u>Idrogeno fosfato di sodio</u>	<u>g 5.0</u>
<u>Soluzione al 5% di solfato di magnesio</u>	<u>ml 0.2</u>
<u>Acqua distillata</u>	<u>ml 900</u>
<u>Egg Yolk emulsion</u>	<u>ml 100</u>

#### 10.6.2 Preparazione

Dissolvere gli ingredienti in acqua distillata. Sterilizzare il terreno in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare il terreno alla temperatura di 45-50 °C. Aggiungere sterilmente 80 ml di Egg yolk emulsion, quindi distribuire in piastre di Petri sterili. pH finale del terreno 7.4 ± 0.2. Conservare le piastre in frigorifero a + 5°C ± 3°C per non oltre 4 settimane.

Prima dell'uso è preferibile mantenere il terreno in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.



POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)</b>	REV. 1
--------------	---	--------

## 11. REQUISITI E MODALITÀ DI MANIPOLAZIONE/CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Tutti i campioni eccetto quelli provenienti da ferite, devono essere mantenuti in condizioni di refrigerazione, preferibilmente non congelati, ed esaminati prima possibile. I campioni prelevati da ferite devono essere trasportati al laboratorio a temperatura ambiente ed in idonei contenitori. Gli alimenti dovrebbero essere possibilmente nel loro contenitore originale.

La quantità ideale di siero da analizzare è 10-15 ml. Questa quantità di campione permette l'identificazione della specifica tossina botulinica ed eventualmente la ripetizione del test, qualora si rendesse necessaria. Volumi minori di 3 ml possono dare risultati non conclusivi.

La quantità ideale di feci o lavaggio intestinale (enema) da prelevare (preferibilmente prima del trattamento con l'antitossina) è di 25-50 g o 25-50 ml, anche se quantitativi minori di campione e prelievi effettuati dopo il trattamento con l'antitossina, hanno permesso la conferma dell'evento di botulismo e l'isolamento dell'agente eziologico. Nel caso di lavaggio intestinale dovrebbe essere utilizzata acqua sterile non batteriostatica. In considerazione del fatto che la stipsi è uno dei segni clinici maggiormente ricorrenti in casi di botulismo, è possibile analizzare anche i tamponi rettali (**valido soltanto nel caso del botulismo umano**). Per quanto riguarda gli alimenti, le confezioni sospette vanno inviate in laboratorio evitando il più possibile la manipolazione del loro contenuto. In ogni caso il quantitativo ideale per effettuare la ricerca completa di tossine botuliniche e clostridi produttori di tossine botuliniche è almeno 50 g e/o ml. È comunque possibile analizzare confezioni contenenti tracce dell'alimento o del suo liquido di governo.

La quantità ideale di coltura di arricchimento da testare per la ricerca delle tossine botuliniche e dei clostridi produttori di tossine botuliniche è 10 ml.

Prima di aprire gli alimenti inscatolati, pulire il coperchio o la parte superiore della scatola con acqua e sapone, sciacquare, rimuovere l'eccesso di acqua e asciugare con una soluzione di alcol etilico al 70%. I contenitori con i fondelli deformati dovrebbero essere raffreddati prima dell'apertura e flambati con estrema cautela.

## 12. PRINCIPIO DEL METODO

### 12.1 Ricerca delle tossine botuliniche

Ricerca delle tossine botuliniche presenti nel campione da analizzare mediante inoculazione intraperitoneale in topini da laboratorio (mouse test).

### 12.2 Ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche

Ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche mediante semina del campione da analizzare in idonei terreni colturali di arricchimento (TPGY, CMF o TPGY tamponato).



POMIAC02.001

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)

REV. 1

Per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche tipo A, B, E, F utilizzare i terreni TPGY oppure TPGY tamponato. Per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche tipo C e D il terreno di arricchimento CMF. Ricerca delle tossine botuliniche prodotte nelle colture di arricchimento mediante mouse test. Parte opzionale: Isolamento di colonie pure e conferma della tossicità. Eventuale identificazione del ceppo isolato.

## 13. DESCRIZIONE DEL PROCEDIMENTO

### 13.1 Tipologia di campione da sottoporre ad analisi

- Campioni alimentari;
- Mangimi;
- Campioni biologici (feci, tamponi rettali, lavaggi intestinali, contenuto gastrico, tessuti e organi interni);
- Colture di arricchimento;
- Campioni ambientali;

### 13.2 Ricerca e tipizzazione delle tossine botuliniche

Aprire asepticamente il campione in una cappa di sicurezza biologica, oppure, in alternativa all'interno di una ampia busta di plastica per evitare la formazione di aerosol.

#### 13.2.1 Protocollo del Mouse Test

*Animali:* topini bianchi da laboratorio (*Mus musculus*) del peso di 15-30 g. Per lo svolgimento di una prova è necessario utilizzare animali di peso omogeneo.

*Materiali di riferimento:* antitossine botuliniche trivalente/polivalente e monovalenti.

*Inoculo degli animali:* iniezione intraperitoneale degli animali (in doppio) con siero o surnatanti trattati secondo gli schemi 1, 2 e 3, usando siringhe da 1 ml con ago "tipo insulina". Per identificare le varie coppie di animali inoculate, colorare ogni set di topi con un pennarello ad acqua. Per evitare che la colorazione venga abrasa dall'animale, colorare il primo tratto della coda e il pelo del dorso in posizione caudale.

*Osservazione degli animali:* Osservare periodicamente per 3 giorni la sintomatologia caratteristica e registrare la morte dei topi utilizzando la scheda, modulo PGPAAC01.18n della Procedura generale PGPAAC 01.00n, collocata sulla gabbietta contenente i topi. I sintomi caratteristici del botulismo nei topi iniziano con arruffamento del pelo, respiro addominale affaticato, debolezza nelle zampe e paralisi totale. La morte è causata da insufficienza respiratoria. La morte dell'animale immediatamente dopo l'inoculo indica la presenza di sostanze non riconducibili alle tossine botuliniche oppure errore dell'operatore che ha effettuato l'inoculo stesso. La morte è utilizzata come parametro per indicare la



POMIAC02.001

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)**

REV. 1

positività come riportato nei successivi schemi 1, 2, 3.

### 13.2.2 Ricerca e tipizzazione delle tossine botuliniche nei campioni di siero

Porre 1 ml di siero in ciascuna di 2 provette. In una provetta aggiungere 0.25 ml di siero antitossine botuliniche trivalente/polivalente. Mescolare la sospensione siero-antitossina evitando la formazione di schiuma.

Incubare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti.

Inoculare 2 topini bianchi da laboratorio per via intraperitoneale con 0.4 ml di siero non trattato e 2 topini con 0.5 ml di miscela siero-antitossine botuliniche trivalente/polivalente (schema 1).

Osservare la sintomatologia caratteristica e registrare la morte dei topi.

**Interpretazione dei risultati:** se nel campione è presente tossina botulinica, i topi inoculati con il campione di cui alla provetta N. 1 (schema 1 o 1A) moriranno entro 3 giorni. I topi inoculati con il campione di cui alle provette N. 2 (schema 1 o 1A) non moriranno in quanto la tossina eventualmente presente viene inattivata dall'antitossina.

#### SCHEMA 1

Provetta N.	Volume di Siero (ml)	Volume di Antitossina (ml)	Tipo di Antitossina	Volume caricato in siringa (ml)	Volume inoculato/topo (ml)
1	1.0	-	-	0.8	0.4
2	1.0	0.25	Trivalente/ <u>polivalente</u> *	1.0	0.5

\*Poiché la tossina tipo F è estremamente rara, l'antitossina trivalente anti A, B, E, sarà sufficiente a confermare la quasi totalità dei casi di botulismo umano. In caso di morte di tutti gli animali inoculati, ripetere il test neutralizzando anche con l'antitossina botulinica anti-F oppure neutralizzare con l'antitossina polivalente. Per l'analisi di campioni relativi al botulismo animale è preferibile l'utilizzo di antitossina polivalente, ma in considerazione della difficoltà di reperimento, lo Schema 1 può essere sostituito dallo Schema 1A.

#### SCHEMA 1A

Provetta N.	Volume di Siero (ml)	Volume di Antitossina (ml)	Tipo di Antitossina	Volume caricato in siringa (ml)	Volume inoculato/topo (ml)
1	1.0	-	-	0.8	0.4
2	1.0	0.25	Trivalente A,B,E	1.0	0.5
3	1.0	0.25+0.25	Anti-C - anti-D	1.0	0.5

Qualora il test di cui allo schema 1 o 1A risultasse positivo e si disponesse di



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)**

REV. 1

sufficiente quantitativo di campione, effettuare la tipizzazione della tossina seguendo lo schema 2 o 2A.

**SCHEMA 2.**

Provetta N.	Volume di campione o estratto (ml)	Volume di Antitossina (ml)	Tipo di Antitossina	Volume caricato in siringa (ml)	Volume inoculato/topo (ml)
1	1.0	-	-	0.8	0.4
2	1.0	0.25	anti- A	1.0	0.5
3	1.0	0.25	anti- B	1.0	0.5
4	1.0	0.25	anti- E	1.0	0.5
5	1.0	0.25	anti- F	1.0	0.5

Per l'analisi dei campioni relativi al botulismo animale lo Schema 2 deve essere sostituito dallo Schema 2A.

**SCHEMA 2A.**

<u>Provetta N.</u>	<u>Volume di campione o estratto (ml)</u>	<u>Volume di Antitossina (ml)</u>	<u>Tipo di Antitossina</u>	<u>Volume caricato in siringa (ml)</u>	<u>Volume inoculato/topo (ml)</u>
<u>1</u>	<u>1.0</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>0.8</u>	<u>0.4</u>
<u>2</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25</u>	<u>anti- A</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>
<u>3</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25</u>	<u>anti- B</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>
<u>4</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25</u>	<u>anti- C</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>
<u>5</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25</u>	<u>anti- D</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>
<u>6</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25</u>	<u>anti- E</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>
<u>7</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25</u>	<u>anti- F</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>
<u>8</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25</u>	<u>anti- G</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>

**Interpretazione dei risultati:** il tipo di tossina presente è indicato dalla morte dei topi inoculati con il campione contenuto nella provetta n.1 e in tutte le provette eccetto quella corrispondente al tipo di antitossina specifica che avrà protetto i topi.

**13.2.3 Ricerca e tipizzazione delle tossine in campioni liquidi (alimenti ed estratti) e/o contenenti una fase acquosa**

Omogenizzare il campione e prelevarne asepticamente un'aliquota.



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)

REV. 1

Centrifugare l'aliquota in centrifuga per 20 minuti a 8000 x g. Qualora il surnatante non risultasse perfettamente limpido è possibile ripetere la centrifugazione, oppure filtrare con filtri tipo Millipore a siringa, con pori del diametro di 0.45 µm.

Porre 1 ml di surnatante in ciascuna di 2 provette. In una provetta aggiungere 0.25 ml di siero antitossina trivalente/polivalente. Mescolare la sospensione surnatante-antitossina evitando la formazione di schiuma. Incubare a temperatura ambiente per almeno 30 minuti.

Porre 1.5-2 ml di surnatante in un'altra provetta e far bollire per 10 minuti a bagnomaria. Inoculare 2 topini per via intraperitoneale con 0.4 ml di surnatante non trattato, 2 topini con 0.5 ml di miscela surnatante-antitossina trivalente/polivalente e 2 topi con 0.5 ml di surnatante trattato al calore (schema 3 o 3A).

Osservare la sintomatologia caratteristica e registrare la morte dei topi.

**Interpretazione dei risultati:** Se nel campione è presente tossina botulinica, i topi inoculati con il campione di cui alla provetta N. 1 (schema 3 o 3A) moriranno entro 3 giorni. I topi inoculati con il campione di cui alle provette N. 2 (schema 3 o 3A) non moriranno in quanto la tossina eventualmente presente viene inattivata dall'antitossina. I topi inoculati con il campione di cui alla provetta N. 3 (schema 3 o 3A) non moriranno in quanto le tossine botuliniche sono termolabili.

SCHEMA 3

Provetta N.	Volume di Surnatante (ml)	Volume di Antitossina (ml)	Trattamento	Volume caricato in siringa (ml)	Volume inoculato/topo (ml)
1	1.0	-	-	0.8	0.4
2	1.0	0.25	Antitossina trivalente/ <u>polivalente</u> *	1.0	0.5
3	1.5	-	bollitura 10 min.	1.0	0.5

\*Poiché la tossina tipo F è estremamente rara, l'antitossina trivalente anti A, B, E, sarà sufficiente a confermare la quasi totalità dei casi di botulismo umano. In caso di morte degli animali di cui alle provette N. 1 e 2, ripetere il test neutralizzando anche con l'antitossina botulinica anti-F oppure neutralizzare con l'antitossina polivalente. Per l'analisi di campioni relativi al botulismo animale è preferibile l'utilizzo di antitossina polivalente, ma in considerazione della difficoltà di reperimento del prodotto, lo Schema 3 può essere integrato come definito nello Schema 3A.



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)	REV. 1
--------------	---	--------

**SCHEMA 3A**

<u>Provetta</u> <u>N.</u>	<u>Volume di</u> <u>Siero</u> <u>(ml)</u>	<u>Volume di</u> <u>Antitossina</u> <u>(ml)</u>	<u>Tipo di</u> <u>Antitossina</u>	<u>Volume</u> <u>caricato in</u> <u>siringa (ml)</u>	<u>Volume</u> <u>inoculato/topo</u> <u>(ml)</u>
<u>1</u>	<u>1.0</u>	-	-	<u>0.8</u>	<u>0.4</u>
<u>2</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25</u>	<u>Trivalente</u> <u>A,B,E</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>
<u>3</u>	<u>1.5</u>	-	<u>Bollitura 10</u> <u>min.</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>
<u>4</u>	<u>1.0</u>	<u>0.25+0.25</u>	<u>Anti-C - anti-D</u>	<u>1.0</u>	<u>0.5</u>

Qualora il test di cui allo schema 3 o 3A risultasse positivo e si disponesse di un sufficiente quantitativo di campione, effettuare la tipizzazione della tossina seguendo lo schema 2 o 2A.

### 13.2.4 Ricerca e tipizzazione delle tossine botuliniche in campioni solidi (alimenti, feci, tessuti, organi interni) e/o contenenti una fase oleosa

Omogenizzare il campione e prelevarne asepticamente un'aliquota in busta stomacher. Aggiungere all'aliquota prelevata 1 ml di tampone fosfato gelatina freddo per ogni g di campione prelevato. Omogeneizzare in stomacher (30 secondi a 230 rpm).

Incubare in frigorifero alla temperatura di  $+3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  per almeno 30 minuti. Le tossine botuliniche rimangono stabili a temperatura di refrigerazione, per cui è possibile protrarre l'incubazione in frigorifero overnight.

Centrifugarne una idonea porzione in centrifuga refrigerata per 20 minuti a  $8000 \times g$ . Qualora il surnatante non risultasse perfettamente limpido è possibile ripetere la centrifugazione oppure filtrare con filtri tipo Millipore a siringa con pori del diametro di  $0.45 \mu\text{m}$ .

Analizzare il surnatante come descritto al punto 13.2.3 (schema 3). Qualora il test di cui allo schema 3 o 3A risultasse positivo, effettuare la tipizzazione della tossina seguendo lo schema 2 o 2 A di cui al punto 13.2.2.

### 13.3 Ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche

#### 13.3.1 Preparazione del campione e allestimento delle colture di arricchimento

Aprire asepticamente il campione in una cappa di sicurezza biologica, oppure, in alternativa all'interno di una ampia busta di plastica per evitare la formazione di aerosol.

**Nota:** Può essere utile effettuare l'osservazione microscopica delle forme microbiche presenti nel campione da sottoporre ad analisi. I clostridi produttori di tossine botuliniche



POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)</b>	REV. 1
--------------	---	--------

*appaiono come bastoncelli sporigeni Gram positivi. Particolarmente importante risulta la posizione e la forma delle spore. C. botulinum appare come un bastoncino con spora debordante in posizione sub-terminale rispetto al corpo bastoncellare, che assume la forma di una racchetta da tennis. C. butyricum appare come un bastoncino con spora non debordante in posizione centrale rispetto al corpo bastoncellare, che assume la forma di una spilla da balia. C. baratii appare come un bastoncino con spora non debordante in posizione sub-terminale rispetto al corpo bastoncellare (appendice n. 1).*

#### 13.3.1.1 Campioni alimentari e mangimi in porzione test da 25 g

**Se si analizzano campioni provenienti da botulismo animale il terreno TPGY o TPFY tamponato deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.**

- Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY tamponato facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria.
- Raffreddare fino alla temperatura di  $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in bagnomaria.
- Seminare il campione in 225 ml di TPGY tamponato omogeneizzando in stomacher (30 secondi a 230 rpm).
- Trattare termicamente il terreno seminato, in bagnomaria a  $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti, quindi raffreddare fino a temperatura ambiente (per rendere più veloce questo passaggio, il terreno inoculato può essere raffreddato in acqua o in bagno di acqua e ghiaccio).
- 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.**
- Proseguire come indicato al successivo punto 13.3.2.
- Per quanto riguarda i campioni alimentari, può essere utile eseguire la misurazione del pH e dell' $a_w$ , in quanto a valori di pH minori di 4.6 e  $a_w$  minore di 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.

#### 13.3.1.2 Residui di campioni alimentari e mangimi

**Se si analizzano campioni provenienti da botulismo animale il terreno TPGY o TPFY tamponato deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.**

- Effettuare una sospensione campione/tampone fosfato gelatina in rapporto 1:1.
- Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare fino alla temperatura di  $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in bagnomaria.



POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)</b>	REV. 1
--------------	---	--------

- C. Prelevare 2 ml della sospensione campione/tampone fosfato gelatina di cui sopra, e seminare in 9 ml di TPGY. Se si dispone di un quantitativo inferiore ad 2 ml, seminare l'intera sospensione campione/tampone fosfato gelatina.

Proseguire quindi secondo quanto descritto nei punti D-G del paragrafo 13.3.1.1.

#### 13.3.1.3 Tamponi rettali

- A. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare fino alla temperatura di  $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in bagnomaria.  
B. Seminare 1-2 tamponi rettali (in base alla quantità di campione depositata nel tampone stessi) in 9 ml di TPGY.

Proseguire quindi secondo quanto descritto nei punti D-F del paragrafo 13.3.1.1.

#### 13.3.1.4 Lavaggi intestinali (enema)

**Se si analizzano campioni provenienti da botulismo animale il terreno TPGY o TPGF tamponato deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.**

- A. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare fino alla temperatura di  $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in bagnomaria.  
B. Seminare 1-2 ml di campione in 9 ml di TPGY.

Proseguire quindi secondo quanto descritto nei punti D-F del paragrafo 13.3.1.1.

#### 13.3.1.5 Campioni fecali, tessuti ed organi interni

**Se si analizzano campioni provenienti da botulismo animale il terreno TPGY o TPGF tamponato deve essere sostituito dal terreno CMF. Tale terreno prima dell'uso deve essere pre-ridotto lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno 2 giorni.**

- A. Effettuare una sospensione campione/tampone fosfato gelatina in rapporto 1:1.  
B. Rimuovere l'ossigeno disciolto nel terreno TPGY facendolo bollire per 10 minuti in bagnomaria. Raffreddare fino alla temperatura di  $70^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in bagnomaria.  
C. Prelevare 2 ml della sospensione campione/tampone fosfato gelatina di cui sopra, e seminare in 9 ml di TPGY. Se si dispone di un quantitativo inferiore ad 2 ml, seminare l'intera sospensione campione/tampone fosfato gelatina.

Proseguire quindi secondo quanto descritto nei punti D-F del paragrafo 13.3.1.1.



POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO COLTURALE E MOUSE TEST)</b>	REV. 1
--------------	---	--------

### 13.3.1.6 Colture di arricchimento

Per le colture di arricchimento procedere direttamente come indicato al successivo punto 13.3.2.

In presenza di quantitativi inferiori ad 3 ml di coltura di arricchimento procedere secondo quanto descritto al precedente punto 13.3.1.4.

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

Prelevare almeno 5 ml della coltura di arricchimento e trattare come indicato al precedente punto 13.2.3 (schema 3 o **3A**). Qualora la ricerca risultasse positiva, effettuare la tipizzazione della tossina utilizzando lo stesso surnatante diluito 1:10 con tampone fosfato gelatina sterile come indicato al precedente punto 13.2.2 (schema 2 o **2A**). La tipizzazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche nelle colture di arricchimento, può essere effettuata anche mediante metodiche biomolecolari di PCR.

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

*Nota. L'isolamento di colonie pure di clostridi produttori di tossine botuliniche, 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.*

*Il seguente paragrafo viene applicato esclusivamente ai fini della caratterizzazione dei ceppi di riferimento prodotti dal CRB.*

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\*** (quest'ultimo è indicato per i ceppi di *C. botulinum* tipo C e D). Per facilitare l'isolamento dei clostridi produttori di tossine botuliniche, prima dello striscio di isolamento può essere utile sottoporre 0.5-1 ml della coltura di arricchimento a trattamento termico in bagnomaria alla temperatura di 70°C ± 1°C per 10 minuti. Qualora si ipotizzasse la presenza di *C. botulinum* tipo E, oppure di *C. butyricum* tipo E (che hanno una resistenza termica minore) è consigliabile effettuare sulla coltura di arricchimento il trattamento con l'alcol invece del trattamento termico. A questo proposito prelevare 0.5-1.0 ml della coltura di arricchimento e aggiungere un uguale volume di alcol assoluto (sterilizzato per filtrazione usando filtri tipo Millipore a siringa con pori del diametro di 0.45µm) ed incubare a temperatura ambiente per un'ora agitando la sospensione ogni 15 minuti.

Incubare le piastre in condizioni di anaerobiosi per 48 h ± 2 h alla temperatura di 37 °C ± 1°C.



POMIAC02.001	<b>METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)</b>	REV. 1
--------------	---	--------

**\* In caso di isolamento dei ceppi di *C. botulinum* tipo C e D pre-ridurre, prima dell'uso, il terreno MCTM lasciandolo in condizioni di anaerobiosi per almeno due giorni.**

#### **13.4.1 Selezione e purificazione delle colonie tipiche**

In piastra di EYA **o MCTM** le colonie tipiche di *C. botulinum* appaiono generalmente rugose con contorno irregolare e mostrano superficie iridescente quando osservate a luce obliqua. Questo effetto è dovuto all'azione della lipasi che dà un aspetto perlaceo e si estende anche oltre la colonia seguendone i contorni. Le colonie di *C. botulinum* tipo C, D ed E possono essere circondate da una zona (2-4 mm) di precipitato biancastro dovuto all'azione della lecitinasi. Le colonie tipiche di *C. butyricum* e *C. baratii* produttori di tossine botuliniche, sono lipasi negative. Appaiono di colore chiaro, leggermente trasparenti con margini irregolari quasi piatte.

Selezionare almeno 5 colonie tipiche e servendosi di un'ansa sterile strisciare ogni colonia su due piastre di EYA **o MCTM**. Incubare una piastra in condizioni di anaerobiosi e una piastra in condizioni di aerobiosi per 48 h  $\pm$  2 h alla temperatura di 37°C  $\pm$  1°C. Se le colonie cresceranno soltanto sulla piastra incubata in anaerobiosi, la coltura può essere considerata pura.

#### **13.4.2 Conferma della tossicità delle colonie tipiche**

Non tutte le colonie tipiche pure sono capaci di produrre tossine botuliniche; è quindi necessario effettuare la conferma di tossicità su un certo numero di colonie. A tal fine selezionare almeno 5 colonie pure e con l'utilizzo di un'ansa sterile trapiantarle in provette di TPGY **(in caso di ceppi di *C. botulinum* tipo C o D trapiantare le colonie pure in provette di CMF)**.

Incubare le provette di TPGY **o CMF** in condizioni di anaerobiosi per 96 h  $\pm$  2 h alla temperatura di **30** °C  $\pm$  1°C.

Trascorso il periodo di incubazione trattare la coltura come indicato al precedente punto 10.1.3.

#### **13.4.3 Tipizzazione delle tossine botuliniche delle colonie singole**

Qualora il mouse test per la conferma della tossicità delle colonie tipiche di cui al precedente punto 10.2.4.2 risultasse positivo, effettuare la tipizzazione delle tossine botuliniche come indicato al precedente punto 10.1.3.

La tipizzazione delle tossine botuliniche dalle colonie singole, può essere effettuata anche mediante metodiche biomolecolari di PCR.



POMIAC02.001	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO COLTURALE E MOUSE TEST)	REV. 1
--------------	---	--------

## 14. CONVALIDA DEI RISULTATI

### 14.1 Ricerca delle tossine botuliniche

Per la ricerca delle tossine botuliniche, sono considerati positivi i test in cui risultano morti i topi inoculati con campioni tal quali, e vivi quelli inoculati con gli stessi dopo trattamento di neutralizzazione delle tossine botuliniche (mediante aggiunta di antitossine o trattamento di bollitura).

La specificità del mouse test è dimostrata dall'uso di antitossine botuliniche trivalenti/polivalenti e monovalenti e dalla morte degli animali inoculati.

### 14.2 Ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche

Per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche, sono considerati positivi i test in cui viene evidenziata presenza di tossine botuliniche nelle colture di arricchimento (punto 11.1).

## 15. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche e la ricerca delle tossine botuliniche viene effettuata con metodo qualitativo ed è espressa come determinazione della presenza o assenza dei clostridi produttori di tossine botuliniche e/o delle tossine botuliniche, nel campione analizzato.

- Qualora sia stata rilevata la presenza di **tossine botuliniche** nel campione esaminato, il risultato si esprime come: *positivo*.
- Qualora **non** sia stata rilevata la presenza di **tossine botuliniche** nel campione esaminato, il risultato si esprime come: *negativo*.
- Qualora sia stata rilevata la presenza di **clostridi produttori di tossina botulinica** nel campione esaminato, il risultato si esprime come: *positivo*.
- Qualora **non** sia stata rilevata la presenza di **clostridi produttori di tossina botulinica** nel campione esaminato, il risultato si esprime come: *negativo*.

## 16. CONTROLLI DI QUALITÀ

Il Controllo di qualità del metodo viene eseguito con cadenza annuale applicando le prescrizioni di cui alla procedura POQMAC01.00n "Controllo di qualità dei metodi microbiologici".

Il Controllo di qualità dei terreni e dei materiali destinati alla microbiologia vengono rispettivamente effettuate applicando le prescrizioni di cui alle IOQTAC01.00n e IOQMAC01.00n.



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001

**METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO COLTURALE E MOUSE TEST)**

REV. 1

## 17. COLLOCAZIONE DELLA PROCEDURA

La copia originale della presente Procedura Operativa è conservata presso l'Archivio del SGQ del Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica gestito dal RAQ-AC.

## 18. DESTINATARI

La presente Procedura Operativa è distribuita in forma controllata a: DD-SP, RAQ-SP, DR-AC, RSA-AC-CRB, RAQ-AC, PT-AC-CRB, TPM1-PM, TPM3-PM.



DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA E DI SICUREZZA  
ALIMENTARE

REPARTO ADEMPIMENTI COMUNITARI E SANITÀ PUBBLICA

POMIAC02.001

METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI  
PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA  
RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE  
(METODO CULTURALE E MOUSE TEST)

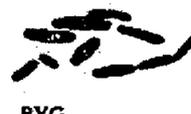
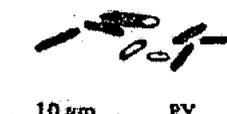
REV. 1

## Appendice 1

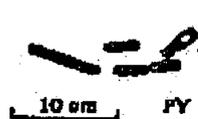
### MORFOLOGIA DEI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE OSSERVATI AL MICROSCOPIO OTTICO



*Clostridium botulinum, type A.*



*Clostridium butyricum.*



*Clostridium baratii.*