

Il botulismo infantile: un network per migliorare la diagnosi e il trattamento di una malattia rara e sotto-diagnosticata

Davide Lonati, Carlo Locatelli, Stefania Bigi, Sarah Vecchio, Valeria Petrolini, Andrea Giampreti, Lucia Fenicia*, Dario De Medici*, Luigi Manzo

Servizio di Tossicologia, Centro Antiveneni di Pavia – Centro Nazionale di Informazione Tossicologica, IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri e Università degli Studi di Pavia

*Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo, Istituto Superiore di Sanità, Roma

SINTESI

Il botulismo infantile è una patologia rara e spesso sotto-diagnosticata, con una incidenza di circa 80-100 casi segnalati annualmente negli USA. In Italia sono stati riportati in tutto 28 casi dal 1984 al 2007.

A differenza del botulismo alimentare (causato dall'ingestione di cibo contaminato da tossine botuliniche) la forma infantile è determinata da una "tossiemia intestinale", causata dalla produzione in vivo della tossina a partire da spore di Clostridium botulinum colonizzanti l'intestino umano.

Il dato epidemiologico più caratteristico è l'interessamento esclusivo di lattanti nel primo anno di vita. Il quadro clinico conclamato è caratterizzato da segni di disfunzione autonoma, precoce coinvolgimento dei nervi cranici e successivo quadro di paralisi flaccida discendente. La diagnosi può essere estremamente difficile perché il quadro cli-

nico varia da forme benigne, pressoché subcliniche e autolimitanti, a forme rapidamente evolutive verso l'insufficienza respiratoria acuta. I tipici sintomi d'esordio del botulismo infantile sono, ad esempio, la stipsi, la difficoltà di alimentazione (di fatto un deficit di suzione e deglutizione per paralisi degli ultimi nervi cranici), il pianto debole e l'ipotonia: queste sono però manifestazioni estremamente comuni e aspecifiche nel lattante, cosicché la diagnosi d'ingresso può essere confusa con quadri di sepsi o meningite, disidratazione severa, ipotonia da causa neurologica e altre patologie. Anche il quadro conclamato può essere di difficile inquadramento diagnostico, in particolare mimando patologie metaboliche (ad es., malattie mitocondriali all'esordio) o condizioni neurologiche, quali l'atrofia muscolare spinale o le poliradicolonevriti periferiche (ad es., Guillain-Barré, Miller Fischer).

Il botulismo infantile è una sindrome neuroparalitica molto grave, ma caratterizzata da una bassa mortalità. I dati epidemiologici indicano che il 90% dei casi si verifica negli USA. Il motivo di ciò non è chiaro, ma potrebbe essere legato a una maggiore conoscenza della malattia da parte dei sanitari. Questo trova riscontro nella epidemiologia nazionale, che è la più numerosa a livello europeo e dove la maggior parte dei casi è stata diagnosticata in

pochi ospedali, dimostrando che dopo la prima esperienza i medici sono maggiormente sensibilizzati verso un adeguato sospetto diagnostico. Si reputa quindi che, soprattutto nelle forme lievi, la malattia, anche nel nostro Paese, sia sottostimata. La malattia, diversamente dal classico botulismo alimentare, non è causata dall'ingestione di tossina preformata in un alimento, ma dalla tossina botulinica prodotta nel lume intestinale da spore neu-

rotossigene ingerite che hanno avuto la possibilità di germinare e moltiplicarsi.

La fonte delle spore è ambientale e i veicoli finora individuati tramite indagini epidemiologiche e di laboratorio sono il miele e, in rarissimi casi, la polvere di casa. Il miele, come prodotto naturale, può veicolare spore che le api raccolgono durante la loro attività e che residuano nel prodotto.

L'indagine effettuata nel nostro Paese, con l'ausilio di un questionario preparato *ad hoc* e sottoposto a pediatri e a 250 madri presso i reparti pediatrici di alcuni ospedali italiani, ha rilevato che il 30% dei pediatri e il 100% delle madri non conosceva la malattia e che il 25% delle madri somministrava il miele al proprio bambino e aveva avuto questa abitudine anche con altri figli. Si può quindi ritenere che la possibilità di sviluppare botulismo infantile per assunzione di miele sia comunque rara, data l'elevata percentuale di bambini che viene a contatto con tale alimento.

La recente evidenza di presenza di spore di *C. botulinum* in fiori di camomilla e altri vegetali disidratati utilizzati per preparare infusi ai lattanti, consuetudine molto diffusa in diversi Paesi tra cui l'Italia, solleva il problema di altre eventuali fonti di spore botuliniche, diverse dal miele, che potrebbero rappresentare un fattore di rischio per i bimbi ed essere eventualmente sconsigliate, così come il miele, almeno in un determinato periodo di vita.

Recentemente è stato dimostrato, in seguito all'isolamento di due ceppi risultati poi identici dopo subtipizzazione molecolare, che anche la polvere di casa può costituire un veicolo di spore di clostridi neurotossigeni. In Italia i casi più recenti sono stati correlati a lavori di ristrutturazione domestica e, anche se non dimostrati, si sospetta l'inalazione come via di contagio.

Appare pertanto utile un'attività di informazione/formazione indirizzata a pediatri, neonatologi, neurologi, tossicologi clinici, rianimatori e medici d'urgenza sui vari aspetti della sindrome al fine di indirizzarne eventualmente il sospetto diagnostico. Se, ad esempio, il miele risulta al momento l'unico alimento correlato all'insorgenza di botulismo infantile, esso può essere eliminato dalla dieta dei lattanti senza particolari problemi. Per ottenere ciò occorre una campagna di informazione presso genitori, pediatri e medici ospedalieri sulla malattia e sui fattori di rischio a essa correlati. D'altra parte, nell'indirizzare le madri in tal senso, i pediatri dovrebbero illustrare con chiarezza il significato di questa restrizione alimentare eliminando dubbi sulla intrinseca tossicità o pericolosità del miele e cir-

coscrivendo chiaramente il problema a bambini al di sotto di un anno di età.

Anche la reale correlazione consumo di miele-insorgenza della malattia andrebbe meglio valutata mediante prove di subtipizzazione molecolare dei ceppi isolati dal miele e dalle feci per stabilirne l'identità, qualora si tratti naturalmente di ceppi appartenenti allo stesso sierotipo.

Definizione di caso

La definizione di caso di botulismo infantile adottata dal CDC di Atlanta e da alcuni Paesi europei, tra cui l'Italia, è la seguente: «malattia dei neonati caratterizzata da costipazione e difficoltà di suzione che può essere seguita da progressiva debolezza, difficoltà di respirazione e morte». I criteri per la diagnosi di laboratorio sono:

1. presenza di tossine botuliniche nelle feci o nel siero;
2. isolamento di un clostridio produttore di tossine botuliniche dalle feci.

Un caso viene classificato come confermato se risulta clinicamente compatibile, se viene confermato in laboratorio e se si è verificato in un bambino con età inferiore a un anno^{1,2}.

Epidemiologia

Globalmente più di 3100 casi di botulismo infantile sono stati diagnosticati dal 1976 al 2007. La maggior incidenza si è riscontrata negli USA, dove la forma infantile è la più frequente con 80-110 casi l'anno e un totale di circa 2600 casi dal 1976 al 2007 (incidenza di circa 2 per 100.000 nati-vivi); seguono l'Argentina con 366 casi dal 1982 al 2005, l'Australia con 32 casi dal 1978 al 2006, l'Italia con 28 casi dal 1984 al 2007 (incidenza di circa 0,2 per 100.000 nati-vivi) e il Canada con 27 casi dal 1979 al 2006³⁻⁵. Per quanto riguarda l'Unione Europea (UE), dal 1978 al 2007 sono stati registrati 71 casi in 14 nazioni.

In Italia dal 1984 a oggi si sono verificati 28 casi di botulismo infantile, dei quali uno correlato a un caso di SIDS. La casistica del nostro Paese è la più numerosa nell'ambito della UE. Nei pochi casi in cui è stato formulato il sospetto diagnostico, la diagnosi clinica è sempre stata confermata dai dati di laboratorio presso il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo. In particolare, la procedura prevede l'analisi dei tamponi rettali, quando non sia possibile ottenere il campione fecale a causa della stipsi. Dai dati epidemiologici nazionali risulta inoltre che, dei 28 pazienti, 17 avevano ingerito del

miele e in 13 casi è stato possibile analizzare residui dell'alimento reperiti nell'abitazione del bambino. In 4 casi sono state isolate spore di *Clostridium botulinum* ma solo in un caso si trattava dello stesso serotipo di quello delle spore isolate dalle feci⁶.

Veicolo delle spore

Le spore dei clostridi neurotossigeni sono presenti normalmente in tutti i tipi di ambiente, sia terrestre sia acquatico. Pertanto il suolo e la polvere giocano sicuramente un ruolo critico quale sorgente di clostridi per i bimbi costituendo una fonte dalla quale le spore, ingerite o inalate, raggiungono l'intestino. Lo studio dei casi di botulismo infantile ha permesso di correlare l'insorgenza della malattia con l'inalazione di spore presenti nell'ambiente circostante il bimbo. Spore tossigene dello stesso tipo di quelle identificate nelle feci del paziente sono state infatti identificate nel suolo e nella polvere dell'aspirapolvere utilizzato in ambiente domestico, dimostrando la possibilità di contaminazione ambientale⁷. Questa via è stata sospettata anche per quanto riguarda i casi italiani. Nel corso dello studio degli ultimi casi è emerso che nella abitazione dei soggetti erano stati effettuati, nei giorni precedenti l'inizio della sintomatologia, lavori di ristrutturazione con evidente incremento dei livelli di polvere presenti nell'aria, anche se indagini di laboratorio fatte al fine di individuare il veicolo ambientale delle spore avevano dato esito negativo.

Il miele rimane il solo veicolo alimentare sicuramente correlato al botulismo infantile da evidenze epidemiologiche e di laboratorio^{6,8,9}. I bimbi sono esposti al miele principalmente quando viene posto sul succhiotto per tranquillizzarli e quando viene addizionato come dolcificante nel latte in polvere e negli infusi.

Il miele, può essere contaminato da spore di clostridi di origine ambientale, probabilmente da polline e nettare inquinati trasportati dalle api bottinatrici.

Indagini effettuate in diversi Paesi su campioni di miele in commercio hanno evidenziato la presenza di spore di *C. botulinum* nel 2-14% dei campioni esaminati, con una notevole variazione tra le differenti aree geografiche¹⁰⁻¹⁴. Ricerche effettuate, invece, su campioni di miele associati a casi di botulismo infantile hanno rilevato cariche in *C. botulinum* notevolmente elevate, fino a circa 104 spore/kg, anche se la ragione non è chiara^{15,16}. Infatti, i livelli di pH (3,4-5,5) e di AW (0,5-0,6) (*Activity Water*: quantità di acqua libera disponibile per la crescita batterica) nel prodotto finale sono sicu-

mente inibenti la crescita e la tossinogenesi di *C. botulinum*, benché le spore rimangano vitali. Inoltre, i trattamenti convenzionali utilizzati per distruggere le spore negli alimenti non possono essere usati nel caso del miele perché altererebbero le caratteristiche organolettiche del prodotto, rendendolo non idoneo al consumo umano.

Un recente studio effettuato in Argentina ha evidenziato la presenza di spore di *C. botulinum* in campioni di camomilla e altri vegetali disidratati utilizzati per preparare infusi normalmente somministrati dalle madri ai lattanti¹⁷.

La malattia: patogenesi e spettro clinico

Il botulismo infantile è la forma intestinale di botulismo che colpisce i lattanti al di sotto di un anno di età. Tale sindrome, riconosciuta per la prima volta in California nel 1976, è causata da clostridi neurotossigeni (*Clostridium botulinum* e più raramente *Clostridium butyricum* o *Clostridium baratii*) che vengono ingeriti sottoforma di spore, sopravvivono all'acidità gastrica e raggiungono l'intestino¹⁸. In conseguenza dell'immaturità della flora intestinale dell'ospite e quindi della competizione batterica, le spore possono germinare, moltiplicarsi, colonizzare temporaneamente il lume intestinale a livello del colon e produrre *in situ* la neurotossina. La mucosa intestinale non viene interessata dall'infezione e la sindrome è stata definita una "tossiemia intestinale"^{4,18}. La tossina viene quindi assorbita dalla mucosa e, attraverso il circolo sanguigno, raggiunge le terminazioni nervose periferiche dove taglia, per via enzimatica, specifiche proteine *target* implicate nel processo di neuroesocitosi. Viene quindi bloccata la trasmissione nervosa, il che si manifesta con una paralisi flaccida simmetrica discendente, caratteristica di tutte le forme di botulismo¹⁹.

I primi sintomi a comparire sono la costipazione, la difficoltà di suzione, l'alterazione del tono del pianto e la letargia. In particolare, nella maggior parte dei casi è proprio la costipazione il primo segno che può essere sottovalutato sia dai genitori sia dai medici nella raccolta anamnestica. Al contrario, i genitori riferiscono prontamente la difficoltà di suzione, identificata dalle madri per la comparsa di dolore, sensazione di tensione e ingorgo mammario. Possono poi presentarsi ptosi, midriasi, disfagia, ipotonia diffusa con difficoltà a mantenere il busto eretto (*floppy-baby*), perdita del controllo del capo fino al coma e all'arresto respiratorio²⁰.

Lo spettro clinico della malattia può essere caratterizzato da forme molto lievi e poco sintomatiche a

forme fatali con decorso fulminante¹⁸. Vi è sicuramente una sottostima delle forme molto lievi e subcliniche che non necessitano del ricovero ospedaliero. In rari casi la malattia è molto grave e indistinguibile dalla *Sudden Infant Death Syndrome* (SIDS)²¹. Il paziente durante la malattia mantiene lo stato di coscienza integro e non sviluppa ipertermia (parametri utili nella diagnostica differenziale). Attualmente in Italia il trattamento aspecifico del botulismo infantile si basa su terapie di supporto; il paziente richiede il ricovero in Reparto di Terapia Intensiva a causa della frequente necessità di supporto respiratorio e alimentazione naso-gastrica. L'alimentazione artificiale attraverso il sondino naso-gastrico, nonostante l'ipomotilità intestinale, risulta ben tollerata e addirittura sembrerebbe migliorare il decorso della malattia favorendo la normalizzazione della flora intestinale. I lassativi/purganti non hanno invece dimostrato di abbreviare il corso della malattia e i clisteri evacuativi sono risultati poco efficaci per eliminare la tossina perché è stato dimostrato che il germe si sviluppa lungo tutto il colon.

La somministrazione di antibiotici non ha alcun effetto sul meccanismo di tossicità della tossina botulinica, mentre può essere necessaria per il trattamento delle eventuali complicanze secondarie, soprattutto dell'apparato respiratorio. Alcuni antibiotici, quali aminoglicosidi e clindamicina sono comunque controindicati per la funzione bloccante l'attività neuromuscolare. Secondo alcuni Autori, inoltre, esisterebbe un rischio teorico di lisi della cellula batterica con successiva liberazione di ulteriore tossina che potrebbe aggravare la sintomatologia neurologica²².

Le possibili complicanze sono rappresentate soprattutto da infezioni a livello respiratorio, infezioni secondarie del tratto urinario (atonia vescicale) o di natura nosocomiale. Una complicanza riscontrata nella casistica americana e in quella italiana è la grave colite da *Clostridium difficile* il quale, presente in maniera asintomatica nel lume intestinale dei lattanti, riesce a moltiplicarsi proprio in seguito alla paralisi causata dalla tossina botulinica^{23,24}.

Storicamente la somministrazione di antitossina botulinica prevede l'uso di siero eterologo equino. Il potenziale effetto sensibilizzante alle proteine equine¹¹, i parametri di farmacocinetica non favorevoli (emivita di 5-7 giorni)²⁵ e gli effetti collaterali²⁶ portano a sconsigliarne l'uso in questa forma di botulismo.

Recentemente l'IBTPP ha condotto *trials* clinici su un siero umano per il trattamento specifico del bo-

tulismo infantile contenente immunoglobuline purificate e ottenute da un *pool* di plasma di adulti immunizzati con l'anatossina pentavalente, dai quali vengono poi selezionate le antitossine contro la tossina A e B²². Attualmente il farmaco denominato BIG-IV (*Botulism Immune Globulin-Intravenous Human*) è autorizzato dall'FDA²⁷ e risulta disponibile negli Stati Uniti e viene inviato su richiesta in tutti i Paesi. L'uso del BIG-IV nei bambini malati ha ridotto i tempi di nutrizione nasogastrica, di ospedalizzazione, di ventilazione meccanica e, conseguentemente, le complicanze dovute alle infezioni secondarie. Quest'ultimo aspetto, inoltre, minimizza le conseguenze dovute all'uso di antibiotici necessari per la cura delle gravi infezioni concomitanti.

Il trattamento con BIG-IV dovrebbe essere iniziato appena formulato il sospetto diagnostico anche in assenza della conferma di laboratorio. Il BIG-IV neutralizza la quota di tossina circolante e non ancora "legata" alla placca neuromuscolare e sembra mantenere una concentrazione efficace per circa 6 mesi. Inoltre, la precoce somministrazione dell'antidoto (entro 1-3 giorni dall'esordio della sintomatologia clinica) sembra ridurre notevolmente (1 settimana circa) il periodo di ospedalizzazione rispetto ai pazienti trattati tra il quarto e il settimo giorno²².

Il BIG-IV è costituito da una singola fiala di polvere liofilizzata contenente approssimativamente 100 mg \pm 20 mg di immunoglobuline da ricostituire con 2 ml di soluzione fisiologica. Il titolo anticorpale nel prodotto così ricostituito è composto da almeno 15 UI/ml di antitossine contro la tossina di tipo A e da almeno 4 UI/ml di antitossine contro la tossina di tipo B (per convenzione e solo per le tossine di tipo A e B, 1 UI di antitossina neutralizza 10.000 DL₅₀ topo di tossina somministrata per via intraperitoneale); il titolo anticorpale riguardante le tossine di tipo C, D ed E non è stato determinato.

La posologia consigliata è di una singola dose pari a 1 ml/kg (50 mg/kg) somministrata per via endovenosa. La velocità di infusione iniziale (per i primi 15 minuti) deve essere di 0,5 ml/kg/ora (25 mg/kg/ora) e successivamente non va superata la dose di 1 ml/kg/ora (50 mg/kg/ora).

La somministrazione deve essere iniziata dopo 30 minuti dalla ricostituzione (per consentire una ottimale solubilizzazione del preparato che non deve essere agitato a causa della formazione di schiuma) e comunque entro le 2 ore dalla ricostituzione; la somministrazione deve essere ultimata entro le 4 ore dalla ricostituzione.

Durante la somministrazione devono essere monitorati strettamente i parametri vitali e l'infusione può essere rallentata in caso di comparsa di effetti avversi minori (ad es., *flushing*) e interrotta alla comparsa di reazioni avverse gravi. La reazione avversa più frequentemente riportata sia nel gruppo di pazienti trattati con BIG-IV (14%) sia in quello trattato con immunoglobuline-placebo (8%) è stata *rash* eritematoso transitorio al viso e al tronco²², anche se un effetto simile è stato osservato in pazienti affetti da botulismo infantile non trattati con immunoglobuline²⁰. Risulta pertanto difficile individuare con precisione la causa di tale *rash* cutaneo; nei due gruppi non sono state registrate anche reazioni di broncospasmo e anafilattiche.

L'antidoto andrebbe utilizzato con cautela nei pazienti con preesistente insufficienza renale o nei pazienti giudicati a rischio di sviluppare insufficienza renale acuta o con nota/pregressa/sospetta reazione avversa a prodotti contenenti immunoglobuline.

Nel caso di botulismo infantile la dose consigliata permette di contrastare e neutralizzare la totalità della tossina circolante²⁸. L'emivita del farmaco sembra essere, similmente agli altri preparati contenenti immunoglobuline, approssimativamente di 28 giorni²⁹.

La durata della malattia varia da pochi giorni a mesi e la guarigione dipende dal tempo necessario a formare nuove giunzioni neuromuscolari a livello della placca motrice.

Sono riportati rari casi di ricadute in lattanti apparentemente completamente guariti. Il significato di questo andamento bifasico è controverso e la causa principale potrebbe risiedere in erronee valutazioni di guarigione e dimissioni troppo precoci¹⁸.

Diagnosi clinica

Casi di botulismo infantile sono stati diagnosticati in tutti i continenti a eccezione dell'Africa, anche se con incidenze molto diverse. Benché la malattia sia stata identificata da circa 30 anni, in considerazione della sua rarità è ancora sicuramente sottostimata e confusa con altre patologie. Infatti, la diagnosi clinica del botulismo infantile si basa su un accurato esame dei sintomi neurologici. La presenza di paralisi multipla coinvolgente i nervi cranici è il segno tipico del quadro clinico del botulismo infantile. Questa sintomatologia può essere accompagnata da pianto flebile, suzione debole, xerostomia, riflesso faringeo o della deglutizione abolito, ipotonia assiale con difficoltà a controllare il capo. La ptosi può non essere evidente fino a quando il bimbo non assume la posizione eretta e/o non vie-

ne sostenuto il capo, mentre le alterazioni dello sguardo e del riflesso pupillare possono essere rilevate solo dopo valutazione neurologica attenta e prolungata.

Gli esami strumentali, pur non evidenziando alterazioni patognomoniche, risultano molto utili nella fase di diagnostica differenziale con le altre patologie neurologiche. L'elettromiografia può identificare un *pattern* caratteristico, ma non sempre diagnostico, denominato BSAPs (*brief-duration, small amplitude, overly abundant motor-unit action potential*)³⁰. Tuttavia la mancanza di alterazioni compatibili con *pattern* BSAPs non esclude la malattia^{18,31}.

Diagnosi di laboratorio

La conferma di laboratorio prevede la presenza di tossina botulinica nel siero e/o nelle feci del paziente o la presenza delle spore di *C. botulinum* o altri clostridi neurotossigeni nelle feci.

Il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo effettua, tra l'altro, la diagnosi di laboratorio dei casi sospetti. In particolare, nel 1984, dopo l'identificazione dei primi casi di botulismo infantile, è stato varato un programma *ad hoc* per la sorveglianza attiva e lo studio della malattia. I primi casi italiani, infatti, presentavano delle peculiarità in relazione a un nuovo agente eziologico identificato in un ceppo di *C. butyricum* produttore di tossina botulinica tipo E. Questo lavoro di sorveglianza attiva ha permesso di raccogliere numerosi dati sia clinici sia microbiologici sulla malattia, riportati in articoli scientifici e *case reports*, e di fornire un supporto ai clinici coinvolti nella gestione dei casi, facendo da punto di raccordo con le strutture specializzate, quali i Centri Antiveneni, spesso in collaborazione con l'IBTPP.

Le indagini di laboratorio prevedono analisi di campioni biologici, alimentari e ambientali. I metodi per la ricerca delle tossine e dell'agente eziologico sono quelli del CDC³² con limitate modifiche. Questi sono fondamentalmente basati su test biotossicologici che prevedono l'uso di animali da laboratorio (*Mouse Test*). Al fine di ridurre l'uso degli animali, recentemente è stato messo a punto un metodo di quadruplex PCR per la ricerca delle spore produttrici di tossine botuliniche di tipo A, B, E ed F. Tale metodo attualmente è utilizzato parallelamente al *Mouse Test* per la diagnosi della malattia e la tipizzazione delle tossine. Quando i campioni lo consentono, viene quantificata la tossina nel siero e nelle feci mediante calcolo della MLD/g e vengono numerate le spore tossigene.

TAB. 1

Principali patologie in diagnosi differenziale con il botulismo infantile³.

	Principali caratteristiche che differenziano il botulismo infantile dalle altre patologie
Sepsi	Normotermia, normalità dei parametri di flogosi, assenza di segni di shock
Meningo-encefalite	Normalità di rachicentesi ed elettroencefalogramma
Malattie metaboliche congenite	Normalità di emogasanalisi, elettroliti sierici e urinari, transaminasi, ammoniemia e acido lattico
Sindrome di Guillain Barré (variante Miller Fisher)	ROT normoevocabili, assenza di dissociazione albumino-citologica liquorale
Intossicazione da insetticidi organofosforici, benzodiazepine	Normalità delle colinesterasi plasmatiche, negatività delle indagini tossicologiche, assenza di risposta a flumazenil
Miastenia congenita	EMG: assenza di esaurimento dopo stimolazione ad alta frequenza
Malattia di Werdnig-Hoffmann	Esordio acuto/subacuto della malattia, reperto EMG non compatibile, ROT normoevocabili

Al fine di permettere il *follow up* della malattia, viene studiata la persistenza nel tempo delle spore tossigene nelle feci dei pazienti anche dopo guarigione clinica e dimissione ospedaliera. Per consentire, inoltre, l'individuazione del veicolo delle spore vengono analizzati campioni di alimento (miele, *baby foods*) nonché campioni di polvere ambientale.

Il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo è attivo 24 ore su 24 presso l'Istituto Superiore di Sanità ed è contattabile ai numeri: 06 4990 2254 o, in orari notturni e nei giorni festivi, 06 4990 2440-2441. I campioni da inviare sono:

- un campione di feci o, in caso di stipsi, 4-5 tamponi rettali per la ricerca delle spore neurotossigene;
- feci o, in caso di stipsi, circa 30 ml di liquido di lavaggio rettale (enema) per la ricerca delle tossine botuliniche.

I campioni devono essere inviati al seguente indirizzo: Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo – Reparto Adempimenti Comunitari – DSPVSA. Istituto Superiore di Sanità – viale Regina Elena 299 – 00161 Roma.

Diagnosi differenziale

La negatività o normalità delle indagini effettuate per la diagnostica differenziale possono essere utili a formulare (per esclusione) la diagnosi di botulismo infantile, che rimane comunque difficile. Tuttavia l'aspetto negativo di tale approccio consiste nel fatto che molte procedure (ad es., rachicentesi) invasive e rischiose potrebbero essere evitate (Tabella 1). Altre patologie che possono mimare la clinica del

botulismo infantile sono l'atrofia midollare spinale di tipo I e specifici disturbi metabolici, quali, ad esempio, l'aciduria glutarica di tipo I, la malattia con urine a sciroppo d'acero, la sindrome di Leigh e il deficit della succinico semialdeide deidrogenasi. I pazienti affetti da atrofia midollare spinale di tipo I non hanno un esordio acuto della sintomatologia, caratteristica invece dei pazienti affetti da botulismo infantile, che presentano tipicamente oftalmoplegia e diminuzione del tono dello sfintere anale, alterazioni assenti nei pazienti affetti da SMA di tipo I. Secondo i dati americani, accanto a una buona dimostrazione della capacità di saper formulare il sospetto diagnostico della sindrome da parte dei clinici, in alcuni casi (fino al 28%) la diagnosi di certezza di botulismo infantile può non essere effettuata a causa dell'impossibilità di ottenere dei campioni di feci per eseguire le indagini di laboratorio³³. A causa della difficoltà diagnostica e della contemporanea necessità di trattare i pazienti con sospetto botulismo infantile (anche in assenza della conferma di laboratorio), alcuni pazienti sono stati sottoposti a trattamento specifico anche se, a posteriori, non sono risultati affetti dalla malattia. Infatti, negli studi condotti dal CDPH²² circa il 5% dei pazienti arruolati dal 1992 al 2005 (trattati con BIG-IV o con placebo) non sono risultati affetti da botulismo infantile. La diagnostica differenziale ha permesso successivamente di formulare le seguenti diagnosi: probabile botulismo infantile (9 pazienti), disordini metabolici (8 pazienti), atrofia muscolare spinale di tipo I (5 pazienti), patologie infettive (3 pazienti) e miscelanea (7 pazienti)³⁴.

Caratterizzazione dell'agente eziologico

L'agente eziologico del botulismo umano è classicamente il *C. botulinum* produttore di tossine di tipo A, B, E ed F. Dati epidemiologici indicano che la maggior parte dei casi di botulismo infantile nel mondo sono causati da *C. botulinum* di tipo A e B. Dal 1979, però, sono state isolate altre specie di clostridi in grado di sintetizzare tossine botuliniche, in particolare il *C. baratii* di produttore di tossina tipo F, isolato in 10 casi di botulismo intestinale (3 lattanti e 6 adulti negli USA, 1 lattante in Ungheria e 1 possibile caso di botulismo alimentare in California), e il *C. butyricum* produttore di tossina tipo E, isolato in 6 casi di botulismo intestinale (4 neonati, 2 ragazzi) in Italia³ e in un caso di botulismo infantile in Giappone.

Fattori di rischio

L'età è l'unico fattore predisponente per il botulismo infantile; infatti, la maggior parte dei casi interessa bambini di età inferiore a 6 mesi (il più piccolo aveva 58 ore) e, comunque, tutti di età inferiore a un anno. Adulti sani e ragazzi ingeriscono, abitualmente, spore di *C. botulinum* senza sviluppare la malattia. Ciò è correlato alla maturazione della microflora intestinale che è quantitativamente e qualitativamente più semplice nei neonati e può non essere in grado, come dimostrato da prove effettuate su modelli animali, di prevenire la colonizzazione dell'intestino da parte di spore di clostridi neurotossigeni³⁵. Lo studio dei fattori che possono influenzare la composizione della microflora ha naturalmente individuato il ruolo centrale della dieta. La microflora dei lattanti è costituita da un minor numero di specie batteriche e la prevalenza dei vari microrganismi dipende in parte dal tipo di allattamento del lattante: solo materno, solo artificiale o misto. Inoltre, la composizione della flora si modifica nel tempo soprattutto quando alimenti solidi, come i cereali, sono aggiunti alla dieta del bambino³⁶. La maggior incidenza dei casi, infatti, è concentrata proprio all'inizio dello svezzamento, quando appunto si verificano i cambiamenti maggiori. La normale microflora del lattante contiene alcune specie di batteri, principalmente *Bifidobacterium* e *Bacteroides*, che *in vitro* possono inibire la moltiplicazione del *C. botulinum*³⁷. Tuttavia, studi epidemiologici non hanno potuto dimostrare una chiara relazione causa-effetto tra il tipo di dieta e l'insorgenza della malattia; infatti, benché la maggior parte dei pazienti fossero allattati al seno, la malattia

si riscontrava più precocemente nei lattanti allattati con latte di formula (7,6 settimane contro 13,7 settimane)³⁸. Questo probabilmente si verifica a causa della presenza (nel latte in polvere) di nicchie ecologiche favorevoli e a causa della mancanza di fattori immunitari (come Ig A secretorie e lattoferrina), invece presenti nel latte materno; a ciò consegue uno stato immunitario più fragile o una microflora intestinale più debole o non bilanciata^{38,39}. Studi comparativi dello stato immunitario dei bambini rilevano una relazione tra ambiente e nutrizione¹⁸. Un altro fattore predisponente l'infezione botulinica nei bimbi, indipendente dal tipo di allattamento, è la ridotta motilità intestinale che può favorire la colonizzazione di spore di clostridi.

Un ulteriore fattore predisponente è stato sospettato in una concomitante infezione virale intestinale. Tale evenienza, studiata in un bambino che ha presentato una coinfezione da *C. botulinum* di tipo A e da enterovirus, potrebbe essere spiegata con una maggiore suscettibilità alla colonizzazione del *C. botulinum* in seguito all'alterazione della mucosa intestinale indotta dagli enterovirus^{40,41}.

Ringraziamenti

Studio realizzato nell'ambito del progetto di ricerca dell'Istituto Superiore di Sanità "Programma Italia-USA Malattie Rare – Infant Botulism" (n. 7MR1/1).

Bibliografia

1. Circolare n. 9 Ministero della Sanità – Dipartimento prevenzione e farmaci. Misure di prevenzione e controllo delle intossicazioni da botulino. 1 luglio 1996.
2. CDC. Case Definitions for Infectious Conditions Under Public Health Surveillance. *MMWR* 1997; 46(RR10): 1-55. <http://www.cdc.gov/>
3. Fenicia L, Anniballi F, Aureli P. Intestinal toxemia botulism in Italy, 1984-2006. Presentato a: 44th Annual Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) Meeting. Asilomar, California, 14-18 October 2007, p. 119.
4. Fenicia L, Anniballi F, Aureli P. Intestinal toxemia botulism in Italy, 1984-2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(6): 385-394.
5. Ferndanze R, Ciccarelli A, Farace M *et al.* Botulism in Argentina from 1922 to 2006. Presentato a: 44th Annual Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) Meeting. Asilomar, California 14-18 October 2007, p. 29.
6. Fenicia L, Ferrini AM, Aureli P *et al.* A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. *Eur J Epidemiol* 1993; 9: 671-673.
7. Nevas M, Lindstrom M, Virtanen A *et al.* Infant botulism acquired from household dust presenting as Sudden Infant Death Syndrome. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 511-513.
8. Arnon SS, Midura TF, Damus K. Honey and other environmental risk factors for infant botulism. *J Pediatr* 1979; 94: 331-336.
9. Aureli P, Franciosa G, Fenicia L. Infant botulism and honey in Europe. A commentary. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 866-868.
10. Kautter DA, Lilly T, Solomon HM *et al.* *Clostridium botulinum* spores in infant foods: A survey. *J Food Protect* 1982; 45: 1028-29.
11. Schocken-Iturrino RP, Carneiro MC, Kato E *et al.* Studies of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 24: 379-382.

Il network italiano per la diagnosi e il trattamento del botulismo infantile

L'incidenza mondiale del botulismo infantile (BI) è strettamente legata alla conoscenza della malattia da parte dei clinici e alla conseguente formulazione di un "sospetto diagnostico" che porta all'individuazione dei casi. Presso il *California Department of Public Health* (CDPH) è attivo già dalla fine degli anni '70 l'*Infant Botulism Treatment and Prevention Program* (IBTPP) per lo studio, la prevenzione e la diffusione delle informazioni sulla malattia. È proprio grazie a tale programma che negli USA si registra la maggiore incidenza al mondo del fenomeno.

In Italia, benché nel 1984 sia stato varato presso il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) un programma *ad hoc* per la sorveglianza attiva della malattia, il botulismo infantile risulta ancora una malattia poco conosciuta dalla classe medica e dai genitori. Al fine di promuovere il riconoscimento, la diagnosi e, in generale, le conoscenze sulla malattia, è stato recentemente elaborato un progetto di ricerca denominato *Infant Botulism* nell'ambito del programma di collaborazione Italia-USA, sezione malattie rare. A tale progetto partecipano Unità Operative dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e del Centro Antiveneni (CAV) della Fondazione Maugeri di Pavia, con la collaborazione scientifica dell'IBTPP.

Il CNRB dell'ISS, oltre all'attività di sorveglianza e di ricerca sui vari aspetti del botulismo infantile mediante la diagnosi di laboratorio dei casi sospetti, la raccolta di dati clinici, epidemiologici e microbiologici, allestirà un web-site informativo con una sezione tecnica destinata agli operatori del settore. Inoltre, si occuperà dello sviluppo e della standardizzazione di una metodica di PCR *Real-Time* per la determinazione rapida e specifica dei clostridi neurotossigeni.

Il CAV della Fondazione Salvatore Maugeri di Pavia si occuperà di migliorare la diffusione della conoscenza della malattia (sia attraverso una programma di prevenzione indirizzato prevalentemente ai genitori, sia attraverso un programma di formazione indirizzato ai medici coinvolti nelle fasi di diagnosi precoce e trattamento) e di fornire un supporto specialistico da parte di medici tossicologi (H24) per la diagnosi precoce e il trattamento specifico.

Servizi che costituiscono il *network* per il miglioramento della diagnosi e cura del botulismo infantile.

Diagnosi clinica e trattamento specifico

Servizio di Tossicologia, Centro Antiveneni di Pavia e
 Centro Nazionale di Informazione Tossicologica
 IRCCS Fondazione Maugeri
 via Maugeri 10
 27100 Pavia
 tel 0382 24444 (Centro Antiveneni H24)
 tel 0382 26261 (Segreteria)
 fax 0382 24605
 email: progetto.iss@fsm.it
www.cavpavia.it

Sorveglianza attiva, registro dei casi e conferma di laboratorio

Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo
 Istituto Superiore di Sanità
 viale Regina Elena, 299
 00161 Roma
 tel 06 49902254 (49902441 notturno e festivi)
 fax 06 49902045
 email: lucia.fenicia@iss.it
www.iss.it

Supporto scientifico

Infant Botulism Treatment and Prevention Program (IBTPP)
 California Department of Public Health (CDPH)
www.infantbotulism.org

12. Nakano H, Sakaguchi G. An unusual heavy contamination of honey products by *Clostridium botulinum* type F and *Bacillus alvei*. *FEMS Microbiological Letters* 1991; 63: 171-177.
13. Aureli P, Ferrini AM, Negri S. Ricerca di spore di *C. botulinum* nel miele. *Riv Soc It Sci Alim* 1983; 6: 457-460.
14. Nevas M, Hielm S, Lindstrom M *et al*. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol* 2002; 72: 45-52.
15. Dodds KL. *Worldwide incidence and ecology of infant botulism*. In: Hauschild AHW, Dodds KL eds. *Clostridium botulinum, Ecology and Control in Foods*. Marcel Dekker Inc, New York, 1993, pp. 105-120.
16. Austin J. Botulism in Canada – Summary for 1995. *Canadian Communicable Diseases Report* 1996; 22: 182-183.
17. Bianco MI, Lúquez C, De Jong LI *et al*. Presence of *Clostridium botulinum* spores in *Matricaria chamomilla* (chamomile) and its relationship with infant botulism. *Int J Food Microbiol* 2008; 121(3): 357-360. Epub 2007 nov 17.
18. Arnon SS. *Infant botulism*. In: Feigen RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL eds. *Textbook of pediatrics Infection Diseases*. 5th ed. Saunders, Philadelphia, 2004, pp. 1758-66.
19. Rossetto O, Montecucco C. Presynaptic neurotoxins with enzymatic activities. *Handb Exp Pharmacol* 2008; 184: 129-170.
20. Long SS, Gajewski JL, Brown LW *et al*. Clinical, laboratory, and environmental features of infant botulism in Southeastern Pennsylvania. *Pediatrics* 1985; 75(5): 935-941.
21. Arnon SS, Damus K, Chin J. Infant botulism: epidemiology and relation to sudden infant death syndrome. *Epidem Rev* 1981; 3: 45-66.
22. Arnon SS, Schechter R, Maslanka SE *et al*. Human botulism immune globulin for the treatment of infant botulism. *N Engl J Med* 2006; 354(5): 462-471.
23. Fenicia L, Da Dalt L, Anniballi F *et al*. A case of infant botulism due to neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* type E associated with *Clostridium difficile* colitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21(10): 736-738.
24. Schechter R, Peterson B, McGee J *et al*. *Clostridium difficile* colitis associated with infant botulism: near-fatal case analogous to Hirschsprung's enterocolitis. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 143-146.
25. Hatheway CH, Snyder JD, Searl JE *et al*. Antitoxin levels in botulism patients treated with trivalent equine botulism antitoxin to toxin types A, B, and E. *J Infect Dis* 1984; 150(3): 407-412.
26. Black RE, Gunn RA. Hypersensitivity reactions associated with botulinum antitoxin. *Am J Med* 1980; 69(4): 567-570.
27. <http://www.fda.gov/cber/products/babybig.htm> (latest access 02/08/2008).
28. Paton JC, Lawrence AJ, Steven IM. Quantities of *Clostridium botulinum* organisms and toxin in feces and presence of *Clostridium botulinum* toxin in the serum of an infant with botulism. *J Clin Microbiol* 1983; 17(1): 13-15.
29. Iivegam EN. Immune globulin intravenous (human) IGIV. In: *Physician's Desk Reference*. 55th ed. Medical Economics Company, Inc, Montvale, New Jersey, 2001, pp. 816-820.
30. Engle WK. Brief, Small, abundant motor-unit action potentials: a further critique of electromyographic interpretation. *Neurology* 1975; 25: 173-176.
31. Long SS. *Clostridium botulinum* (botulism). In: Long SS, Pickering LK, Prober CG eds. *Principles and Practice of Pediatrics Infectious Disease*. 2nd ed. Churchill Livingstone, New York, 2002, pp. 984-991.
32. CDC. Botulism in the United States, 1899-1996. Handbook for epidemiologists, clinicians, and laboratory workers. CDC, Atlanta, 1998, pp. 15-21.
33. Leone V, Milocco C, Facchini S *et al*. Botulismo infantile in Romagna: descrizione del primo caso. *Medico e Bambino pagine elettroniche* 2002; 5(2) http://www.medicoebambino.com/?id=CL0202_20.html.
34. Francisco AM, Arnon SS. Clinical mimics of infant botulism. *Pediatrics* 2007; 119(4): 826-828.
35. Burr DH, Sugiyama H. Susceptibility to enteric botulinum colonisation of antibiotic-treated adult mice. *Infect Immun* 1982; 36: 103-106.
36. Stark PL, Lee A. Clostridia isolated from the feces of infants during the first year of life. *J Pediatr* 1982; 100(3): 362-365.
37. Sullivan NM, Mills DC, Riemann HP *et al*. Inhibition of growth of *Clostridium botulinum* by intestinal microflora isolated from healthy infants. *Microbiol Ecol Health Dis* 1988; 1: 179-192.
38. Arnon SS, Damus K, Thompson B *et al*. Protective role of human milk against sudden death from infant botulism. *J Pediatr* 1982; 100(4): 568-573.
39. Arnon SS. Breast feeding and toxigenic intestinal infections: missing links in crib death? *Rev Infect Dis* 1984; 6 (Suppl 1): S193-201.
40. Fenicia L, Franciosa G, Pourshaban M *et al*. Intestinal toxemia botulism in two young people caused by *Clostridium butyricum* type E. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1381-87.
41. Fenicia L, Anniballi F, Pulitanò S *et al*. A severe case of infant botulism caused by *Clostridium botulinum* type A with concomitant intestinal viral infections. *Eur J Pediatr* 2004; 163(8): 501-502. Epub 2004 may 29.

ABSTRACT

Infant Botulism is a form of human botulism in which ingested spores of Clostridium botulinum germinate, colonize the infant's colon, in which they produce botulinum neurotoxin. After the toxin is absorbed, binding to peripheral cholinergic synapses occurs, causing flaccid paralysis. The incidence of infant botulism is low, but some underestimation is likely to exist: the disease is difficult to diagnose because its wide spectrum of clinical manifestations which are not pathognomic. Moreover, failure to recognise the disease is probably related to the low index of suspicion: in fact, the experience of clinicians is fundamental in recognising infant botulism.

A specific project has been promote to improve knowledge of the disease by training physicians (pediatricians, neurologists, clinical toxicologists) to look out for the pos-

sible presence of Infant Botulism cases and improving public awareness through a prevention program. Standardization of therapeutic protocol also by treatment with specific therapeutic measures will be disseminated.

A staff of physicians specialized in Clinical Toxicology will be available, 24 hours a day and seven days/week in the Pavia Poison Centre – National Toxicology Information Center. According to the project, this Centre acts as Reference Center for the clinical diagnosis and the treatment of infant botulism for the correct recognition of typical syndrome, the early diagnosis and the possible therapy with particular attention to antidotic treatment. The National Reference Centre for Botulism at the Istituto Superiore di Sanità will offer a 24-hours diagnostic laboratory service to support diagnose in suspected cases of botulism.