



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PAVIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttrice Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN FARMACIA

***Clostridium botulinum* e tossina botulinica**
dalla patogenesi del botulismo alle applicazioni terapeutiche e al
ruolo del farmacista

Relatore: Chiar.mo Prof. Pietro Grisoli

Tesi di Laurea: Filippo Maria Romagnoli

Matricola: 491143

Anno Accademico 2025-2026

INDICE

1. INTRODUZIONE_____

2. *Clostridium botulinum*_____

Caratteristiche microbiologiche e patogenetiche

2.1 Cenni storici.....	5
2.2 Inquadramento tassonomico.....	7
2.3 Caratteristiche morfologiche e fisiologiche.....	7
2.4 Sporificazione e resistenza ambientale.....	9
2.5 Condizioni di crescita e produzione della tossina.....	10
2.6 Distribuzione ambientale e geografica.....	11
2.7 Gruppi fisiologici e sierotipi.....	12

3. LA NEUROTOSSINA BOTULINICA_____

Struttura e meccanismo d'azione

3.1. Classificazione delle neurotossine botuliniche.....	14
3.2. Struttura molecolare e organizzazione funzionale.....	15
3.3. Assorbimento e trasporto della tossina.....	17
3.4. Interazione con le terminazioni nervose.....	18
3.5. Il complesso SNARE e il blocco del rilascio di acetilcolina.....	19
3.6. Effetti sulla trasmissione neuromuscolare.....	19

4. IL BOTULISMO_____

Epidemiologia, patogenesi e manifestazioni cliniche

4.1. Epidemiologia e trasmissione.....	22
4.2. Botulismo alimentare.....	23
4.3. Botulismo infantile e altre forme intestinali.....	25
4.4. Botulismo da ferita e forme rare.....	27
4.5. Quadro clinico, complicanze e prognosi.....	28

5. II BOTULISMO_____

Diagnosi, trattamento e prevenzione della malattia

5.1 Diagnosi clinica e differenziale.....	31
5.2 Diagnostica microbiologica.....	32
5.3 Trattamento di supporto e terapia antitossinica.....	34
5.4 Prevenzione del botulismo alimentare e casi di attualità.....	36

6. DALLA TOSSINA AL FARMACO

Applicazioni terapeutiche della neurotossina botulinica

6.1 Dalla neurotossina al farmaco.....	41
6.2 Preparazioni farmaceutiche e caratteristiche principali.....	42
6.3 Meccanismo d'azione nell'uso terapeutico.....	43
6.4 Principali applicazioni terapeutiche.....	44
6.5 Uso della neurotossina nella medicina estetica.....	47
6.6 Sicurezza, controindicazioni ed eventi avversi.....	48

7. IL RUOLO DEL FARMACISTA

7.1. Il farmacista nella prevenzione e nell'educazione sanitaria.....	51
7.2 Gestione dei medicinali a base di neurotossina botulinica.....	52
7.3 Farmacovigilanza e sicurezza.....	53
7.4 Contrasto al uso improprio e ai prodotti contraffatti.....	55

8. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

9. RINGRAZIAMENTI

10. BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

Il botulismo è una malattia rara ma potenzialmente grave, causata dall'azione delle neurotossine prodotte principalmente da *Clostridium botulinum*, un batterio anaerobio e sporigeno ampiamente diffuso nell'ambiente. Le caratteristiche microbiologiche di questo microrganismo, in particolare la capacità di formare spore resistenti e di produrre neurotossine in condizioni favorevoli, rivestono un ruolo fondamentale nello sviluppo della malattia e nelle modalità con cui essa può manifestarsi. Nonostante il numero limitato di casi, il botulismo rappresenta un'importante problematica sanitaria, in quanto può causare una progressiva paralisi muscolare e, nelle forme più gravi, compromettere la funzionalità respiratoria.

La peculiarità della tossina botulinica risiede tuttavia nella sua duplice natura. La stessa molecola responsabile del botulismo viene oggi utilizzata anche come farmaco in numerosi ambiti della medicina. La conoscenza del suo meccanismo d'azione e lo sviluppo di preparazioni farmaceutiche standardizzate hanno reso possibile l'utilizzo della tossina botulinica, a dosi controllate, nel trattamento di diverse patologie neurologiche e in numerosi altri ambiti della medicina. Il suo impiego si è inoltre progressivamente diffuso anche nel campo della medicina estetica.

Lo studio delle caratteristiche microbiologiche di *Clostridium botulinum* e dei meccanismi attraverso cui viene prodotta e agisce la neurotossina è fondamentale per comprendere sia la patogenesi del botulismo sia le applicazioni terapeutiche della tossina. Le conoscenze acquisite in ambito microbiologico e farmacologico hanno infatti permesso di trasformare una sostanza responsabile di una grave malattia in uno strumento terapeutico utilizzato in numerosi contesti clinici. In questo quadro, il farmacista riveste un ruolo importante sia nella prevenzione del botulismo sia nella promozione di un uso corretto e sicuro dei medicinali a base di tossina botulinica. Attraverso l'educazione sanitaria, l'informazione al cittadino e la farmacovigilanza, il farmacista può contribuire a prevenire i rischi legati alla malattia e a favorire un impiego appropriato della tossina. Lo scopo di questo lavoro è approfondire le caratteristiche microbiologiche di *Clostridium botulinum* e il meccanismo d'azione della neurotossina botulinica, analizzando il ruolo della tossina nella patogenesi del botulismo e le sue principali applicazioni terapeutiche ed estetiche. Verranno inoltre descritti gli aspetti epidemiologici e clinici della malattia, le principali strategie di diagnosi, trattamento e prevenzione e il ruolo del farmacista nella promozione della sicurezza e dell'appropriatezza d'uso.

Clostridium botulinum

Caratteristiche microbiologiche e patogenetiche

2.1 Cenni Storici

La storia del botulismo e della sua tossina si sviluppa lungo tre secoli: si parte dall'individuazione di una grave intossicazione alimentare, si passa all'isolamento del batterio e si arriva infine all'uso della tossina come farmaco [1].

Le prime notizie dettagliate sulla malattia risalgono alla fine del Diciottesimo secolo in Germania. Tra il 1793 e il 1795, nel Ducato di Württemberg, si verificarono diversi casi di paralisi e decessi legati al consumo di insaccati fatti in casa, soprattutto sanguinaccio [2]. All'epoca le tecniche di conservazione erano scarse e si basavano su una leggera affumicatura e sulla salatura. Questo ambiente senza ossigeno all'interno dell'insaccato creava le condizioni ideali per lo sviluppo del batterio e della sua tossina [3].



Figura 1 Justinus Kerner (1786-1862)

La prima descrizione clinica del botulismo fu scritta dal medico tedesco Justinus Kerner (Fig.1).

Tra il 1817 e il 1822, Kerner studiò più di 230 pazienti colpiti da questa intossicazione [4]. Nel suo lavoro descrisse i sintomi principali della malattia: palpebre cadenti, pupille dilatate, visione doppia, difficoltà a deglutire, secchezza della bocca e una progressiva paralisi muscolare che poteva portare alla morte per soffocamento [5].

Kerner capì che la causa era un veleno biologico che si formava nella carne conservata male. Ipotezzò anche che questa sostanza, se somministrata in piccolissime dosi, avrebbe potuto curare le malattie legate all'iperattività dei muscoli o dei nervi [6].

Nel 1870, il medico tedesco Heinrich Küster inventò il termine "botulismo", dalla parola latina *botulus* che significa "salsiccia" [7]. Il batterio responsabile della malattia fu scoperto solo alla fine dell'Ottocento. Nel 1895, nel paese belga di Ellezelles, ci fu un'epidemia durante un pranzo funebre: 34 persone si ammalarono dopo aver mangiato del prosciutto crudo salato [8]. Il microbiologo Émile Pierre van Ermengem analizzò i campioni di prosciutto e i tessuti delle vittime, riuscendo ad isolare un batterio anaerobio e sporigeno che chiamò *Bacillus botulinus* [9]. Van Ermengem dimostrò che il batterio non moltiplicava direttamente nell'uomo, ma produceva una tossina nell'alimento prima che questo venisse consumato. Fu così chiarito per la prima volta il concetto di intossicazione alimentare da tossina preformata [10].

Nel Novecento la ricerca fece importanti passi avanti. Negli anni '20 il microrganismo venne riclassificato all'interno del genere *Clostridium* con il nome di *Clostridium botulinum* [11]. Nel 1928, P. Tessmer Snipe e Hermann Sommer riuscirono a purificare per la prima volta la tossina botulinica in forma grezza [12]. Nel 1949, il gruppo di ricerca di Arnold Burgen scoprì il meccanismo d'azione della tossina: essa blocca il rilascio di acetilcolina nei punti di contatto tra nervi e muscoli, impedendo così la contrazione muscolare [13].

La trasformazione della tossina in un vero e proprio farmaco avvenne tra gli anni '60 e '80 grazie all'oftalmologo Alan B. Scott e al biochimico Edward J. Schantz [14]. Scott cercava una cura non chirurgica per lo strabismo, capace di indebolire temporaneamente i muscoli dell'occhio. Dopo i primi test sugli animali, nel 1980 pubblicò i risultati dei primi studi sull'uomo per la cura dello strabismo e del blefarospasmo, cioè la chiusura involontaria delle palpebre [15, 16].

Nel 1989 la Food and Drug Administration (FDA) americana approvò il primo farmaco a base di tossina botulinica di tipo A, conosciuto poi con il nome commerciale di Botox®, per trattare lo strabismo e le contrazioni involontarie dei muscoli del viso [17]. Negli anni successivi le applicazioni aumentarono. Nel 1993 si scoprì che la tossina poteva bloccare la sudorazione eccessiva, aprendo la strada al trattamento dell'iperidrosi [18]. Nel 2002 la FDA approvò l'uso del Botox® per motivi estetici, in particolare per ridurre le rughe della fronte e delle sopracciglia [19]. Oggi la tossina botulinica viene usata in molti campi

della medicina, come il trattamento della spasticità muscolare, dell'emicrania cronica e dei problemi della vescica.

2.2 Inquadramento tassonomico

Il batterio *Clostridium botulinum* appartiene dal punto di vista tassonomico al dominio dei Bacteria, al phylum *Bacillota* (storicamente noto come *Firmicutes*), alla classe *Clostridia*, all'ordine *Clostridiales* e alla famiglia *Clostridiaceae* [20]. All'interno di questa famiglia, il genere *Clostridium* comprende un gruppo eterogeneo di batteri a forma di bastoncino (bacilli), Gram-positivi, privi di citocromi, anaerobi obbligati e capaci di produrre endospore ad alta resistenza.

Il nome *Clostridium* deriva dal greco kloster (che significa "fuso"), proprio a indicare la forma a fuso assunta dalla cellula batterica durante la fase di sporificazione, quando la spora al suo interno ne deforma la struttura [21].

Sebbene il nome *Clostridium botulinum* identifichi tradizionalmente l'agente eziologico del botulismo, in realtà dal punto di vista microbiologico non si tratta di un'unica specie omogenea perché presenta diversi sierotipi. Sotto questa denominazione sono raccolti ceppi batterici con caratteristiche fisiologiche e genetiche anche molto diverse tra loro, accomunati principalmente dalla capacità di sintetizzare neurotossine botuliniche (BoNT).

In base alla neutralizzazione sierologica e alle caratteristiche immunologiche delle tossine prodotte, i ceppi vengono distinti in sette sierotipi principali, indicati con le lettere dell'alfabeto dalla A alla G [22]:

- I sierotipi **A, B, E e F** sono i principali responsabili del botulismo nell'uomo.
 - I sierotipi **C e D** causano prevalentemente il botulismo negli animali (come volatili, bovini e altri mammiferi).
- Il sierotipo **G** (riclassificato da alcuni autori come *Clostridium argentinense*) è stato isolato più raramente dal terreno e non è chiaramente associato a casi clinici frequenti.

2.3 Caratteristiche morfologiche e fisiologiche

Dal punto di vista morfologico, *Clostridium botulinum* si presenta come un bacillo di forma rettangolare, con estremità arrotondate. Le cellule vegetative hanno una larghezza compresa tra 0,5 e 1,2 micrometri e una lunghezza che varia da 1,6 a 22 micrometri [23].

I bacilli si possono osservare al microscopio sia isolati sia disposti in coppie o in brevi catene.

Attraverso la colorazione di Gram, le cellule vegetative giovani appaiono Gram-positive (Fig.2). Tuttavia, nelle colture più vecchie o in fase di invecchiamento, la parete cellulare si modifica e i batteri possono mostrare una reazione Gram-variabile o Gram-negativa [24]. La maggior parte dei ceppi di *Clostridium botulinum* è provvista di flagelli peritrichi, ovvero distribuiti su tutta la superficie cellulare, che garantiscono al batterio una buona mobilità nell'ambiente liquido.

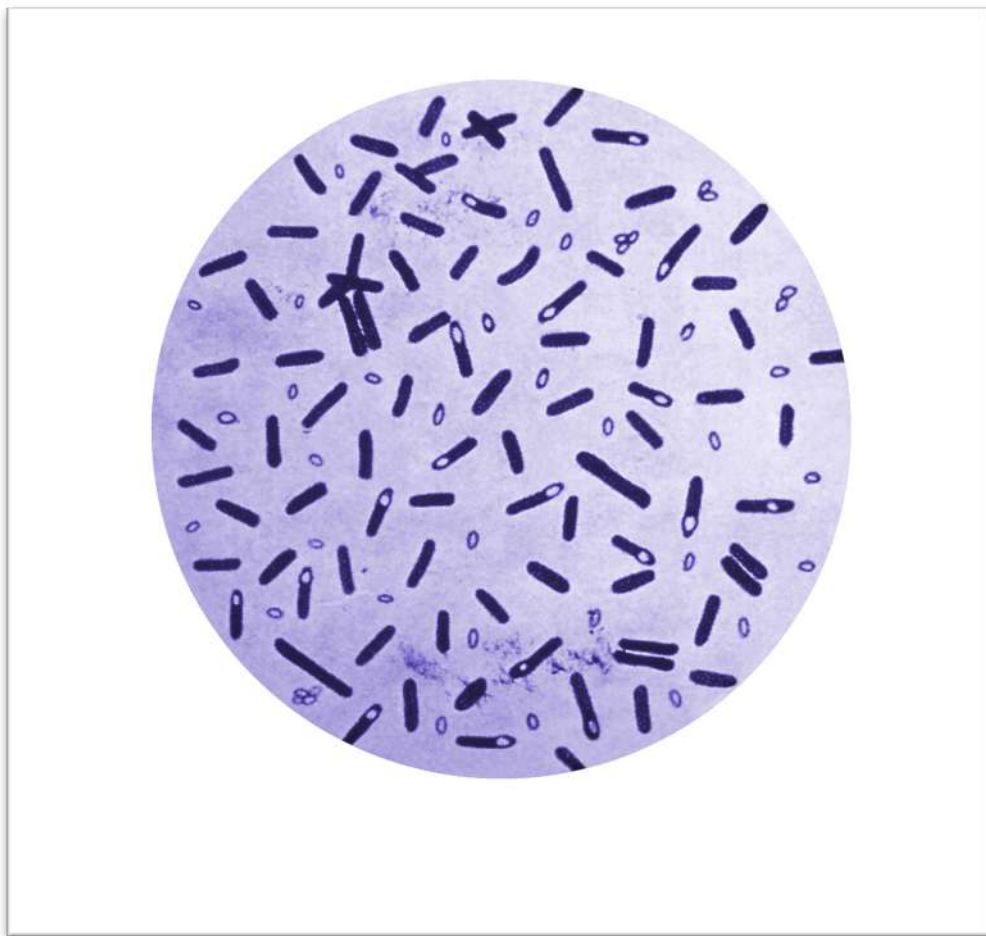


Figura 2. Microfotografia di Clostridium botulinum colorato con violetto di genziana

Una delle caratteristiche morfologiche più importanti è la capacità di produrre una singola endospora all'interno della cellula [25]. La spora ha una forma ovale e si sviluppa solitamente in posizione subterminale o terminale. Durante la fase di sporificazione, la presenza della spora provoca un rigonfiamento della cellula batterica, dandole una caratteristica forma "a fuso" o "a racchetta".

Dal punto di vista fisiologico, *Clostridium botulinum* è un organismo anaerobio obbligato [26]. Questo significa che il batterio non può crescere in presenza di ossigeno molecolare, il quale risulta tossico per le sue cellule vegetative in quanto privo degli enzimi necessari per neutralizzare i radicali liberi dell'ossigeno. Il microrganismo trae l'energia necessaria per il suo sostentamento principalmente dalla fermentazione degli aminoacidi o dei carboidrati.

In base alle loro caratteristiche metaboliche e fisiologiche, le diverse varianti di *Clostridium botulinum* si dividono in due grandi categorie: ceppi proteolitici e ceppi non proteolitici [27]. I ceppi *proteolitici* sono capaci di demolire le proteine (idrolisi della gelatina e della carne), producendo composti solforati dall'odore sgradevole e causando l'incurvamento delle scatole delle conserve. I ceppi *non proteolitici*, al contrario, fermentano principalmente i zuccheri e non alterano visibilmente l'aspetto o l'odore dell'alimento contaminato, rendendo più difficile l'individuazione della contaminazione.

2.4 Sporificazione e resistenza ambientale

La capacità di produrre endospore rappresenta il principale meccanismo di sopravvivenza di *Clostridium botulinum* di fronte a condizioni ambientali sfavorevoli, quali la carenza di nutrienti, la disidratazione, la presenza di ossigeno o le variazioni di temperatura [28].

Il processo di sporificazione è un fenomeno complesso che si attiva quando la cellula vegetativa rileva uno stress ambientale. Durante questo processo, il batterio replica il proprio materiale genetico e lo racchiude all'interno di una struttura multistrato altamente disidratata e protetta da rivestimenti proteici e peptidoglicanici. La spora contiene un'elevata concentrazione di acido dipicolinico combinato con ioni calcio (Ca^{2+}), una miscela fondamentale per stabilizzare il DNA e garantire la resistenza termica. Quando la spora si è completamente formata, la cellula madre va incontro a lisi, rilasciando la spora nell'ambiente esterno. In questo stato di quiescenza, il metabolismo è praticamente azzerato e la spora può rimanere vitale per decenni [29].

Le endospore di *Clostridium botulinum* mostrano un'eccezionale resistenza ai principali agenti fisici e chimici:

- ✓ **Resistenza al calore:** Le spore dei ceppi proteolitici sono estremamente termoresistenti. Esse possono sopravvivere alla bollitura dell'acqua (100°C) per diverse ore [30]. Per inattivarle completamente è necessario un trattamento termico in autoclave a 121°C per almeno 3 minuti (il cosiddetto "botulinum cook"

impiegato nell'industria conserviera). Le spore dei ceppi non proteolitici sono invece meno resistenti al calore e vengono inattivate a temperature di circa 90°C per 10 minuti.

- ✓ **Resistenza ai fattori chimici e alle radiazioni:** Le spore resistono all'azione dei comuni disinfettanti alcolici, ai detergenti e agli acidi, oltre a mostrare una spiccata tolleranza alle radiazioni UV e alle radiazioni ionizzanti [31].

Quando le condizioni ambientali ritornano favorevoli—ovvero in assenza di ossigeno, con un'adeguata presenza di acqua, un pH non acido e la presenza di nutrienti adeguati—la spora va incontro al processo di germinazione. La spora assorbe acqua, perde il suo rivestimento protettivo e riattiva il metabolismo, trasformandosi nuovamente in una cellula vegetativa in grado di moltiplicarsi e di produrre la neurotossina botulinica [32].

2.5 Condizioni di crescita e produzione della tossina

La crescita di *Clostridium botulinum* e la produzione della neurotossina dipendono da diverse condizioni ambientali e chimico-fisiche [33]. Essendo un batterio anaerobio obbligato, il microrganismo si sviluppa soprattutto in ambienti poveri o privi di ossigeno, come può accadere in alcune conserve alimentari, nei prodotti confezionati sottovuoto o nei tessuti necrotici.

Un fattore particolarmente importante è rappresentato dal pH. In generale, la crescita del batterio e la germinazione delle spore sono ostacolate in ambienti acidi. Un valore di pH inferiore a 4,6 viene comunemente considerato sfavorevole allo sviluppo di *Clostridium botulinum* e costituisce quindi un importante parametro di sicurezza nella conservazione degli alimenti [34]. Gli alimenti con pH più elevato richiedono invece maggiori precauzioni e adeguati trattamenti di conservazione.

Anche la disponibilità di acqua influenza la crescita del microrganismo. L'attività dell'acqua esprime la quantità di acqua libera disponibile per i processi metabolici e può essere ridotta, ad esempio, attraverso l'aggiunta di sale o zucchero, contribuendo così a limitare la crescita batterica.

La temperatura rappresenta un ulteriore fattore determinante [35]. I ceppi proteolitici si sviluppano preferenzialmente a temperature moderate, mentre i ceppi non proteolitici possono crescere anche a temperature più basse. Questa caratteristica è particolarmente importante dal punto di vista alimentare, perché alcuni ceppi possono rappresentare un rischio anche nei prodotti conservati in refrigerazione [36].

La neurotossina botulinica viene prodotta durante la crescita del batterio e successivamente rilasciata nell'ambiente circostante. La produzione della tossina dipende quindi dalla presenza di condizioni favorevoli alla germinazione delle spore, alla moltiplicazione delle cellule vegetative e alla loro attività metabolica.

2.6 Distribuzione ambientale e geografica

Clostridium botulinum è un microrganismo ubiquitario, presente in numerosi ambienti naturali, tra cui il suolo, i sedimenti marini e il tratto intestinale di diverse specie animali. La sua distribuzione non è tuttavia uniforme e può variare in relazione alle caratteristiche ambientali e geografiche delle diverse aree.

La sopravvivenza delle spore nell'ambiente è influenzata da diversi fattori, tra cui il pH del terreno, la salinità e la composizione minerale. In alcune regioni, particolari condizioni ambientali possono inoltre favorire la diffusione del botulismo negli animali. Un esempio è rappresentato da alcune aree dell'Africa meridionale, dove la carenza di fosforo nel

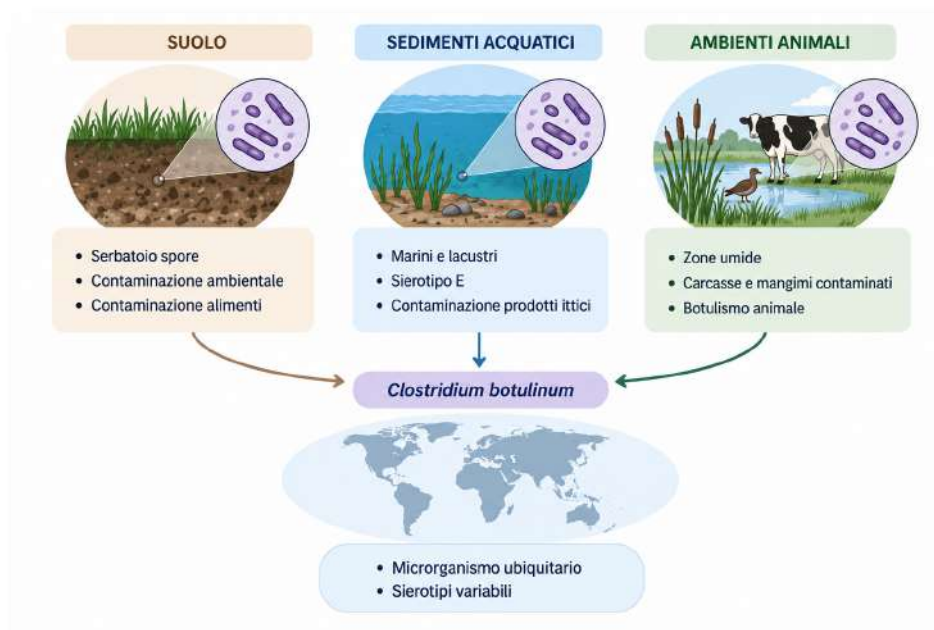


Figura 3. Distribuzione ambientale e geografica del *C Botulinum*

terreno può favorire nei bovini comportamenti di osteofagia, con conseguente possibile ingestione di materiale contaminato da spore (Fig.3).

Anche la distribuzione dei diversi sierotipi di *Clostridium botulinum* varia in base alla regione geografica. In Europa e in Italia, il tipo B rappresenta uno dei sierotipi maggiormente associati ai casi di botulismo umano e agli alimenti contaminati, mentre i tipi A ed E vengono riscontrati con minore frequenza. Il tipo E è soprattutto associato agli ambienti acquatici e ai prodotti ittici conservati [37].

In Italia, la diffusione di *Clostridium botulinum* è influenzata dalla grande varietà di ambienti e di caratteristiche dei suoli presenti sul territorio [38]. Il sierotipo B risulta particolarmente diffuso nei terreni agricoli, mentre il tipo A viene riscontrato con minore frequenza. Il tipo E è maggiormente associato agli ambienti marini e ai sedimenti delle aree costiere. I tipi C e D, invece, sono principalmente correlati al botulismo animale e possono essere presenti nelle zone umide e nei sedimenti di bacini di acqua dolce.

Nel complesso, la presenza ambientale delle spore rappresenta un importante serbatoio naturale del microrganismo e contribuisce a spiegare la possibile contaminazione degli alimenti e l'insorgenza di casi di botulismo nell'uomo e negli animali.

2.7 Gruppi fisiologici e sierotipi

I ceppi appartenenti alla specie *Clostridium botulinum* presentano un'elevata eterogeneità genetica e fenotipica. Per questo motivo sono stati suddivisi in quattro gruppi fisiologici distinti (indicati con i numeri romani da I a IV), ciascuno con specifiche caratteristiche metaboliche, termoresistenze e profili di tossina prodotta [39].

Il Gruppo I comprende i ceppi proteolitici, capaci di digerire le proteine e di produrre idrogeno solforato. Essi sintetizzano le neurotossine di tipo A, B o F. Le spore di questo gruppo possiedono la più alta resistenza termica e la temperatura minima di crescita è di circa 10°C. I ceppi del Gruppo I sono tra i principali responsabili del botulismo umano da conserve vegetali o insaccati [40].

Il Gruppo II è costituito da ceppi non proteolitici che fermentano i carboidrati senza degradare le proteine. Producono le neurotossine di tipo B, E o F [41]. Le spore del Gruppo II sono meno resistenti al calore rispetto a quelle del Gruppo I, ma i batteri possiedono la capacità di moltiplicarsi a temperature di refrigerazione (fino a 3,3°C). Il Gruppo II è frequentemente associato al botulismo da prodotti ittici o cibi refrigerati.

Il Gruppo III include ceppi che producono le tossine di tipo C o D. Questo gruppo è responsabile principalmente del botulismo negli animali domestici e selvatici, come

bovini, cavalli, volatili acquatici e pesci d'allevamento [42]. Gli animali contraggono l'infezione spesso ingerendo mangimi o acqua contaminati da carcasse in decomposizione.

Il Gruppo IV comprende ceppi proteolitici ma privi di attività saccarolitica, che producono la tossina di tipo G. Questo gruppo è stato successivamente riclassificato dal punto di vista tassonomico come una specie a sé stante, denominata *Clostridium argentinense* [42]. È stato isolato raramente dal terreno e da casi umani isolati.

Oltre a questi gruppi, nel 2013 è stato identificato un nuovo sierotipo denominato tossina di tipo H (o BoNT/FA) [44]. A causa dell'elevatissima letalità e dell'iniziale assenza di un'antitossina specifica per neutralizzarla, le sequenze genetiche complete non sono state inizialmente rese pubbliche per motivi di biosicurezza e prevenzione del bioterrorismo.

Tutti questi sierotipi agiscono sul sistema nervoso bloccando il rilascio presinaptico dell'acetilcolina, ma la conoscenza del singolo sierotipo è fondamentale dal punto di vista clinico: le antitossine impiegate in terapia sono specifiche e una siero-protezione diretta verso un determinato tipo di tossina non è efficace contro gli altri sierotipi.

LA NEUROTOSSINA BOTULINICA

Struttura e meccanismo d'azione

3.1 Classificazione delle neurotossine botuliniche

Le neurotossine botuliniche (BoNT, *Botulinum Neurotoxins*) sono tossine prodotte principalmente da *Clostridium botulinum* e, più raramente, da altre specie di *Clostridium*, come *C. baratii* e *C. butyricum* (Tab. 1) [45].

Tradizionalmente, le neurotossine botuliniche vengono classificate in sette sierotipi principali, indicati con le lettere dalla A alla G (BoNT/A-BoNT/G). La distinzione tra i diversi sierotipi si basa principalmente sulle loro proprietà antigeniche e, in particolare, sulla risposta a specifici anticorpi neutralizzanti. Ogni sierotipo presenta infatti caratteristiche antigeniche proprie e viene neutralizzato dal corrispondente antisiero specifico [45].

All'interno dello stesso sierotipo possono essere presenti ulteriori variazioni. Per questo motivo sono stati identificati diversi sottotipi, indicati aggiungendo un numero al sierotipo di appartenenza, come ad esempio BoNT/A1, BoNT/A2 o BoNT/B1. A differenza dei sierotipi, la distinzione in sottotipi si basa principalmente sulle differenze nella sequenza amminoacidica della neurotossina [46]. In generale, per l'identificazione di nuovi sottotipi è stata proposta una differenza superiore al 2,6% nella sequenza amminoacidica rispetto ai sottotipi già conosciuti, anche se tale criterio non è applicabile in maniera assoluta a tutti i sottotipi descritti [46].

I diversi sierotipi non presentano la stessa importanza dal punto di vista clinico. I tipi A, B, E e, più raramente, F sono quelli maggiormente associati al botulismo nell'uomo, mentre i tipi C e D interessano soprattutto gli animali. Il tipo G, prodotto da *Clostridium argentinense*, è molto raro e presenta una rilevanza clinica limitata [45].

Nonostante le differenze antigeniche e molecolari, tutte le neurotossine botuliniche condividono la capacità di interferire con la trasmissione colinergica, determinando un blocco del rilascio di acetilcolina dalle terminazioni nervose [45]. Dal punto di vista farmacologico, particolare importanza rivestono soprattutto le neurotossine di tipo A e B, utilizzate per la produzione delle principali formulazioni di tossina botulinica impiegate a scopo terapeutico [45].

Sierotipo	Principale associazione	Rilevanza nell'uomo	Impiego terapeutico
BoNT/A	Botulismo umano	Elevata	Sì
BoNT/B	Botulismo umano	Elevata	Sì
BoNT/C	Principalmente botulismo animale, soprattutto negli uccelli	Molto rara	No
BoNT/D	Principalmente botulismo animale, soprattutto nei bovini	Molto rara	No
BoNT/E	Botulismo umano, spesso associato a prodotti ittici	Elevata	Non di uso clinico corrente
BoNT/F	Botulismo umano	Rara	Non di uso clinico corrente
BoNT/G	Isolata principalmente da campioni ambientali	Molto limitata	No

Tabella 1- Classificazione delle neurotossine botuliniche.

3.2 Struttura molecolare e organizzazione funzionale

Le neurotossine botuliniche (*BoNT*) prodotte dai diversi sierotipi di *Clostridium botulinum* hanno una struttura e organizzazione funzionale omologa tra loro pur presentando variazioni nella sequenza amminoacidica [47]. Nella loro forma nativa, queste proteine possiedono una potenza neuromuscolare relativamente bassa e necessitano di un processo di attivazione proteolitica per acquisire la loro piena attività tossica.

La tossina viene inizialmente sintetizzata dal batterio come un singolo cursore polipeptidico inattivo, con un peso molecolare di circa 150 kilodalton (*kDa*). Successivamente, l'azione di proteasi endogene (prodotte dai ceppi proteolitici) o di proteasi dell'ospite (nel caso dei ceppi non proteolitici) effettua un taglio proteolitico specifico. Questo taglio proteico converte la singola catena in una struttura attiva, costituita da due catene polipeptidiche distinte unite tra loro [48]:

- **Catena leggera (*Light chain, L*):** Ha un peso molecolare di circa 50 *kDa* ed è situata all'estremità ammino-terminale della proteina.
- **Catena pesante (*Heavy chain, H*):** Ha un peso molecolare di circa 100 *kDa* e costituisce la porzione carbossi-terminale.

Le due catene rimangono covalentemente legate da un singolo ponte disolfuro, affiancato da interazioni non covalenti. La presenza e l'integrità del ponte disolfuro sono essenziali per la tossicità dell'intera molecola (Fig.4). Se questo legame viene ridotto o spezzato chimicamente, la tossina perde la sua capacità di penetrare nel terminale presinaptico e la sua tossicità viene quasi del tutto eliminata, poiché la catena leggera da sola non è in grado di attraversare la membrana cellulare [49].

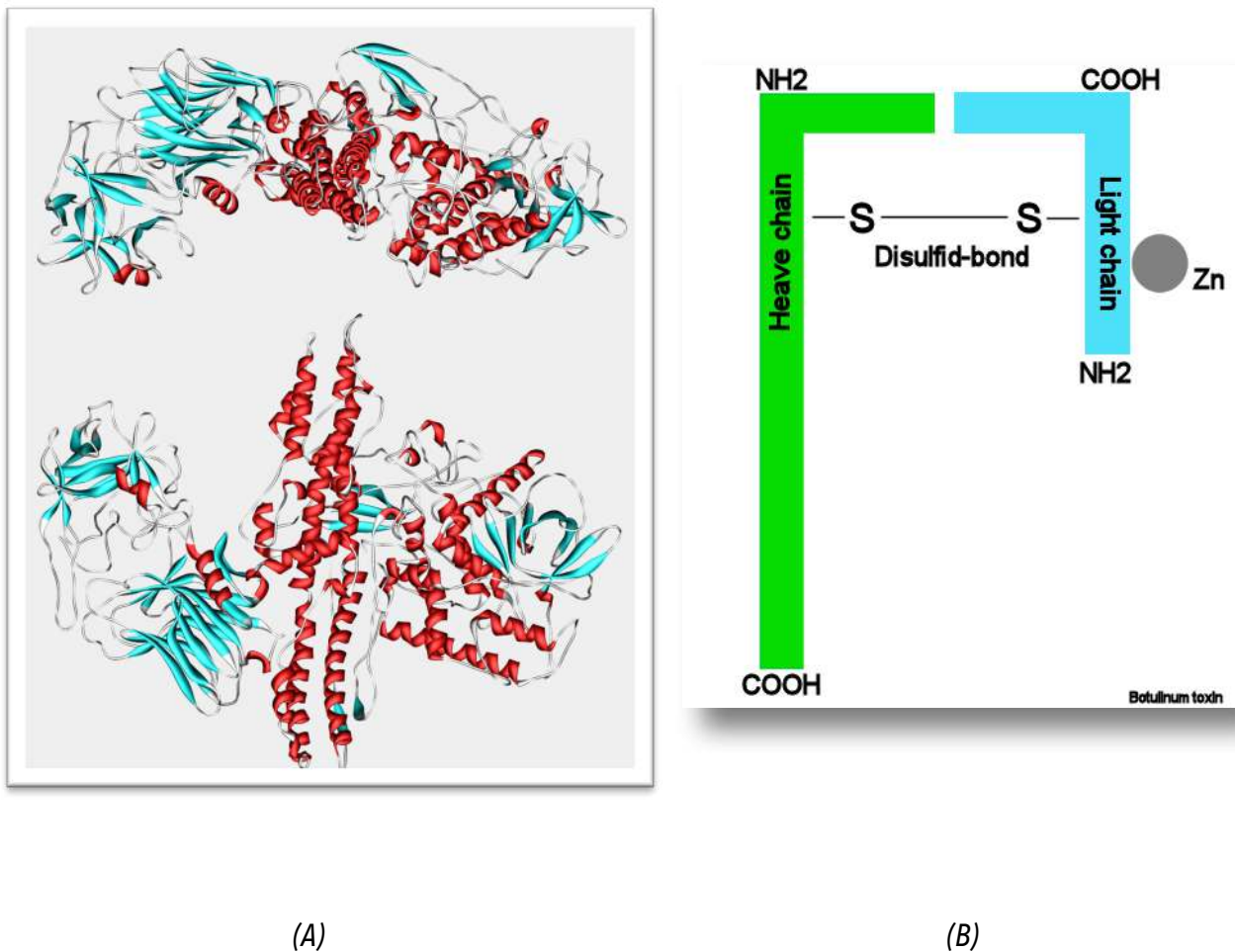


Figura 4. Struttura molecolare 3D (A) e modello schematico (B) della tossina botulinica

- **La catena pesante** (amminoacidi 449-1280) è suddivisa funzionalmente in due domini principali:
 - Il dominio carbossi-terminale (H_C), responsabile del riconoscimento specifico e del legame ad alta affinità con i recettori situati sulla membrana delle terminazioni nervose colinergiche.
 - Il dominio amino-terminale (H_N), noto come dominio di traslocazione, che facilita il passaggio della catena leggera attraverso la membrana endosomiale nel citosol del motoneurone.

- **La catena leggera** funziona invece come una metalloproteasi dipendente dallo zinco. Al suo interno si trova un sito attivo conservato che coordina un atomo di zinco (Zn^{2+}), fondamentale per l'attività catalitica di scissione delle proteine bersaglio del complesso *SNARE*.

3.3 Assorbimento e trasporto della tossina

Dopo l'ingresso nell'organismo, la neurotossina botulinica deve raggiungere le terminazioni nervose periferiche per poter esercitare la propria azione. Le modalità attraverso cui la tossina viene assorbita dipendono principalmente dalla forma di botulismo. Nel *botulismo alimentare*, la tossina viene ingerita attraverso alimenti contaminati e deve attraversare il tratto gastrointestinale prima di raggiungere la circolazione. Nonostante la sua natura proteica e le dimensioni relativamente elevate, la neurotossina riesce a superare la barriera epiteliale intestinale. In natura, inoltre, la tossina può essere associata ad altre proteine non tossiche formando complessi che contribuiscono alla sua stabilità e possono facilitarne la persistenza nell'ambiente gastrointestinale. Una volta raggiunto l'intestino, la tossina attraversa l'epitelio e può quindi entrare nella circolazione sistemica [50,51]. Nel *botulismo da ferita*, invece, la tossina viene prodotta localmente in seguito alla germinazione delle spore e alla proliferazione del microrganismo in condizioni favorevoli all'interno della ferita. Nel *botulismo intestinale*, la produzione della tossina avviene direttamente nel tratto gastrointestinale in seguito alla colonizzazione da parte dei microrganismi produttori. In entrambi i casi, la tossina prodotta localmente viene successivamente assorbita e può raggiungere la circolazione [50]. Una volta entrata nel circolo sanguigno, la neurotossina viene distribuita nell'organismo e raggiunge principalmente le terminazioni nervose colinergiche periferiche, in particolare quelle localizzate a livello della giunzione neuromuscolare. La tossina non agisce quindi direttamente sulle fibre muscolari, ma sulla componente nervosa responsabile della liberazione del neurotrasmettitore. Il raggiungimento delle terminazioni nervose rappresenta il passaggio necessario affinché possano avvenire il riconoscimento della membrana presinaptica e la successiva internalizzazione della tossina, processi alla base della sua azione [50].

3.4 Interazione con le terminazioni nervose

Una volta raggiunte le terminazioni nervose periferiche, la neurotossina botulinica deve legarsi alla membrana presinaptica ed essere internalizzata all'interno della cellula nervosa. Questo processo avviene attraverso una serie di passaggi specifici che permettono alla tossina di riconoscere in modo selettivo le terminazioni nervose e di trasferire la sua componente attiva nel citoplasma neuronale [50,52].

Il riconoscimento della terminazione nervosa avviene principalmente mediante la catena pesante della tossina. Il legame alla superficie neuronale viene generalmente descritto attraverso un modello a due recettori (*dual-receptor model*).

- (1) In una prima fase, la tossina interagisce con specifici gangliosidi presenti sulla membrana presinaptica. Questa interazione favorisce la concentrazione della neurotossina sulla superficie della terminazione nervosa e facilita il successivo legame con specifici recettori proteici.
- (2) Dopo il legame con la membrana presinaptica, la neurotossina viene internalizzata mediante endocitosi e incorporata all'interno di vescicole intracellulari. L'ambiente progressivamente acido presente all'interno delle vescicole determina un cambiamento conformazionale della tossina, necessario per le fasi successive del suo meccanismo d'azione [52].

La neurotossina botulinica è costituita da una catena pesante e una catena leggera, unite da un ponte disolfuro. Durante il processo di internalizzazione, una porzione della catena pesante favorisce la traslocazione della catena leggera attraverso la membrana della vescicola. La catena leggera può così raggiungere il citoplasma della terminazione nervosa, dove esercita la propria attività enzimatica [50].

Il passaggio della catena leggera nel citoplasma rappresenta quindi un momento fondamentale dell'azione della tossina: dopo il riconoscimento selettivo della terminazione nervosa e l'internalizzazione, la componente attiva dal punto di vista catalitico della neurotossina entra in contatto con i suoi bersagli intracellulari. I target cellulari della tossina botulinica sono le proteine coinvolte nel processo di fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana presinaptica e, di conseguenza, nel rilascio dei neurotrasmettitori [50].

3.5 Il complesso SNARE e il blocco del rilascio di acetilcolina

All'interno della terminazione nervosa, è la catena leggera della tossina botulinica a svolgere un'azione enzimatica sulle proteine coinvolte nel rilascio del neurotrasmettitore. Nello specifico, il principale bersaglio dell'azione della tossina è il **complesso SNARE** (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*), un sistema proteico fondamentale per l'ancoraggio e la fusione delle vescicole sinaptiche con la membrana presinaptica [50,53].

A livello delle terminazioni nervose colinergiche, l'acetilcolina è contenuta all'interno di vescicole sinaptiche. In condizioni fisiologiche, l'arrivo del potenziale d'azione alla terminazione nervosa determina una serie di eventi che portano alla fusione di queste vescicole con la membrana presinaptica e alla conseguente liberazione dell'acetilcolina nello spazio sinaptico. Il complesso SNARE svolge un ruolo essenziale in questo processo ed è costituito principalmente da tre proteine: sinaptobrevina, nota anche come VAMP (*vesicle-associated membrane protein*), localizzata sulla membrana delle vescicole sinaptiche; sintaxina e SNAP-25, localizzate sulla membrana presinaptica. L'interazione tra queste proteine permette l'avvicinamento delle membrane che contengono il neurotrasmettitore, rendendo così possibile la fusione delle vescicole con la membrana presinaptica e il rilascio del neurotrasmettitore nello spazio sinaptico. [50]

L'azione enzimatica della catena leggera della neurotossina botulinica è quella di una **endopeptidasi zinco-dipendente** ed è in grado quindi di tagliare in modo specifico le proteine appartenenti al complesso SNARE portando quindi all'inattivazione di queste proteine. L'inattivazione delle proteine del complesso SNARE blocca il processo di fusione delle vescicole presinaptiche con la membrana e impedisce così l'esocitosi del neurotrasmettitore (acetilcolina). [53]

Il blocco del rilascio di acetilcolina determina quindi un'interruzione della normale comunicazione tra la terminazione nervosa e la fibra muscolare con effetti su tutto l'organismo.

3.6 Effetti sulla trasmissione neuromuscolare

Il blocco del rilascio di acetilcolina causato dalla neurotossina botulinica altera la normale trasmissione dell'impulso nervoso a livello della giunzione neuromuscolare. In condizioni fisiologiche, l'acetilcolina liberata dalla terminazione nervosa si lega ai recettori presenti sulla

membrana della fibra muscolare, permettendo la trasmissione del segnale necessario alla contrazione muscolare. Quando il rilascio di acetilcolina viene bloccato dalla tossina, questo meccanismo viene interrotto e la capacità del muscolo di contrarsi si riduce (Fig.5) [50,53].

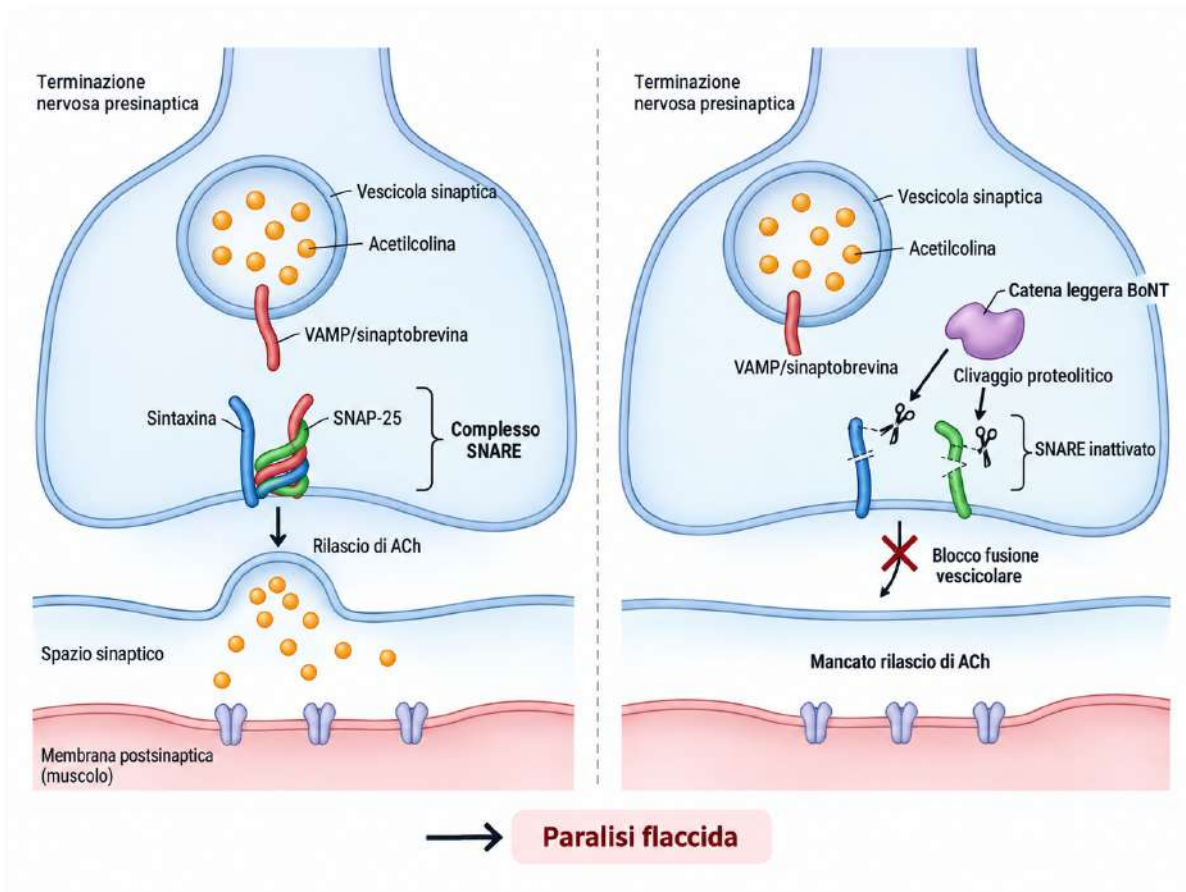


Figura 5. Schema del meccanismo d'azione della tossina botulinica.

L'effetto può variare da una semplice riduzione della forza muscolare fino alla paralisi flaccida, in base alla quantità di tossina e al numero di terminazioni nervose coinvolte. Questo effetto rappresenta la conseguenza principale dell'azione della tossina botulinica sulla trasmissione neuromuscolare e costituisce la base delle manifestazioni cliniche del botulismo.

Il blocco della trasmissione neuromuscolare non è permanente. Con il passare del tempo, la terminazione nervosa recupera progressivamente la capacità di rilasciare acetilcolina e la funzione neuromuscolare viene ristabilita. La durata dell'effetto può variare in relazione al tipo di neurotossina e alle caratteristiche dell'esposizione [50,53]. La capacità della tossina botulinica di determinare una riduzione temporanea e reversibile dell'attività neuromuscolare rappresenta anche il principio alla base del suo

impiego terapeutico. Quando viene somministrata localmente e in quantità controllate, questa azione può infatti essere utilizzata per ridurre l'attività muscolare in diverse condizioni patologiche.

IL BOTULISMO

Epidemiologia, patogenesi e manifestazioni cliniche

4.1 Epidemiologia e trasmissione

Il botulismo è una malattia rara, ma potenzialmente grave, diffusa in tutto il mondo. *Clostridium botulinum* è presente nell'ambiente sotto forma di spore, che possono essere ritrovate soprattutto nel terreno e nei sedimenti acquatici. Grazie alla loro elevata resistenza, le spore possono persistere a lungo nell'ambiente e, quando si trovano in condizioni favorevoli, possono germinare dando origine alle forme vegetative del batterio. La produzione della tossina avviene principalmente in condizioni di anaerobiosi ed è favorita da particolari caratteristiche dell'ambiente o dell'alimento, come una bassa concentrazione di ossigeno e un pH non sufficientemente acido [54].

Nell'uomo il botulismo può svilupparsi attraverso differenti modalità (Fig.6):

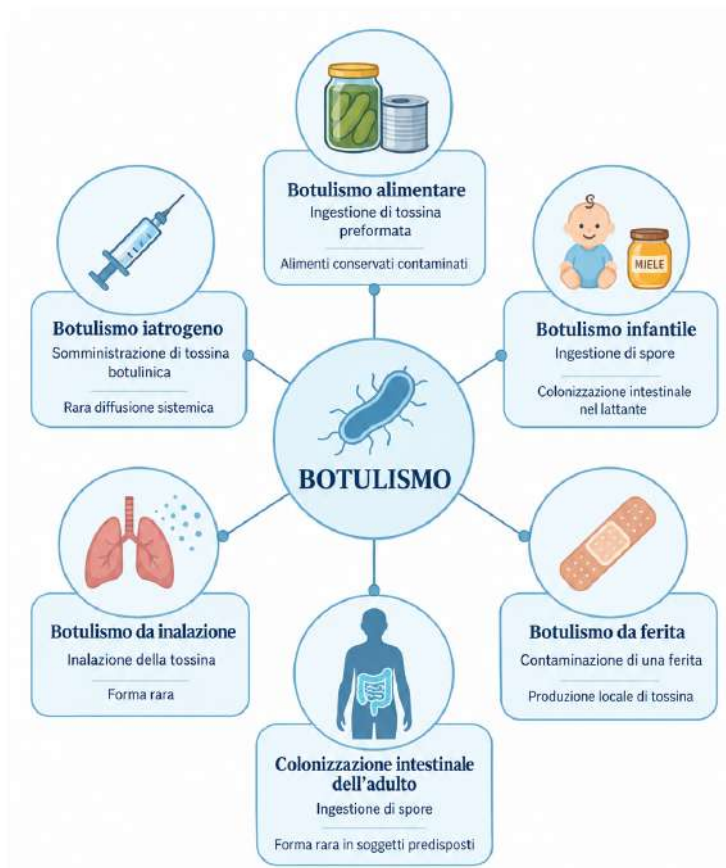


Figura 6. Principali forme di trasmissione del Botulismo.

- » **Botulismo alimentare:** è la forma più conosciuta ed è dovuto all'ingestione di tossina botulinica già formata all'interno di un alimento. Questo può verificarsi soprattutto quando gli alimenti vengono conservati o preparati in condizioni che consentono la germinazione delle spore e la successiva produzione della neurotossina. Le conserve domestiche preparate in modo non adeguato rappresentano una delle fonti più frequentemente associate a questa forma di botulismo;
- » **Botulismo infantile e da colonizzazione intestinale:** sono forme rare e dovuto all'ingestione delle che successivamente germinano nell'intestino e producono la tossina direttamente nell'organismo;
- » **Botulismo da ferita:** in questa forma, le spore contaminano una lesione e, in condizioni locali favorevoli, possono germinare e produrre la tossina [54]. Il botulismo non viene trasmesso da persona a persona;
- » **Altre forme rare:** botulismo iatrogeno e da inalazione.

Dal punto di vista epidemiologico, la frequenza delle diverse forme può variare nei diversi Paesi in relazione alle abitudini alimentari, alle modalità di conservazione degli alimenti e ad altri fattori ambientali. In Italia il botulismo alimentare rappresenta storicamente la forma più frequente ed è spesso associato al consumo di conserve domestiche preparate in modo non corretto [55]. In uno studio di sorveglianza relativo al periodo 1986-2015, la maggior parte dei casi italiani confermati era infatti costituita da botulismo di origine alimentare, mentre il botulismo infantile, quello da ferita e quello da colonizzazione intestinale dell'adulto risultavano molto meno frequenti [55].

4.2 Botulismo Alimentare

Il botulismo alimentare è una forma di intossicazione causata dall'ingestione di alimenti nei quali la neurotossina botulinica è stata prodotta prima del consumo. La contaminazione iniziale dell'alimento è generalmente dovuta alla presenza di spore di *Clostridium botulinum*, microrganismo ampiamente diffuso nell'ambiente, in particolare nel terreno e nei sedimenti. La semplice presenza delle spore, tuttavia, non è sufficiente a determinare la produzione della tossina: è necessario che, durante la preparazione o la conservazione dell'alimento, si creino condizioni favorevoli alla loro germinazione e alla crescita delle forme vegetative [57]. Tra i principali fattori che favoriscono questo processo vi sono la ridotta disponibilità di ossigeno, un pH superiore a 4,6, un'elevata disponibilità di acqua e temperature compatibili con la crescita del microrganismo.

Anche la concentrazione di sale, zuccheri e altri conservanti può influenzarne lo sviluppo. Per questo motivo, gli alimenti conservati in condizioni di anaerobiosi o di ridotta presenza di ossigeno possono rappresentare un rischio quando non vengono contemporaneamente sottoposti a un adeguato trattamento termico, acidificazione o ad altri sistemi di conservazione capaci di impedire la germinazione delle spore e la produzione della tossina [57,58].

La contaminazione può avere origine già dalle materie prime, poiché le spore presenti nel terreno e nell'ambiente possono raggiungere facilmente vegetali e altri prodotti alimentari. Il botulismo alimentare è associato soprattutto alle conserve domestiche preparate in maniera non corretta (Fig.7), ossia in quei casi in cui non è stato fatto un trattamento termico sufficiente o un'acidificazione adeguata per la distruzione delle spore [57,58].

Gli alimenti coinvolti possono variare in relazione alle abitudini alimentari e alle tecniche di conservazione nelle diverse aree geografiche.

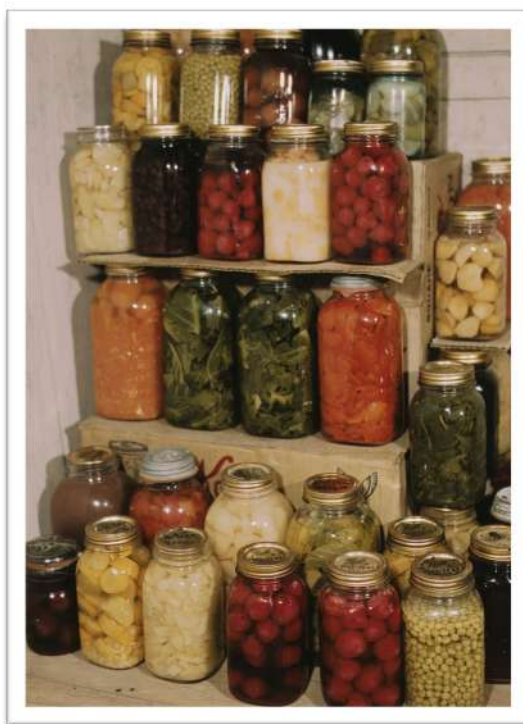


Figura 7. Esempi di conserve domestiche

Tra quelli maggiormente associati al botulismo possiamo elencare:

- conserve vegetali a bassa acidità, come verdure e legumi conservati in casa e alcune preparazioni sott'olio;
- prodotti carnei conservati, tra cui insaccati e prosciutti;
- prodotti ittici, soprattutto pesce conservato, affumicato, salato o fermentato;

- salse, condimenti e altre preparazioni artigianali o casalinghe [57].

Un aspetto importante è che la presenza della tossina botulinica non determina necessariamente alterazioni evidenti dell'alimento. L'assenza di modificazioni dell'odore, del colore o del sapore non permette quindi di poter escludere la contaminazione dell'alimento, aumentando così il rischio di ingestione da parte del consumatore [58]. Sebbene il rischio sia maggiormente associato alle produzioni domestiche, episodi di botulismo possono verificarsi anche in relazione ad alimenti prodotti industrialmente quando il processo di lavorazione o di conservazione non sono stati adeguati.

Dopo l'ingestione, la tossina già presente nell'alimento attraversa il tratto gastrointestinale e viene assorbita a livello intestinale. In seguito raggiunge il circolo sanguigno, attraverso il quale viene distribuita alle terminazioni nervose periferiche [57]. Nel botulismo alimentare è quindi la tossina preformata nell'alimento a raggiungere l'organismo, diversamente da quanto avviene nel botulismo infantile e nelle altre forme da colonizzazione intestinale, nelle quali la neurotossina viene prodotta successivamente alla germinazione delle spore nell'intestino.

Il periodo di incubazione è generalmente compreso tra 12 e 72 ore dall'ingestione dell'alimento contaminato, anche se sono possibili intervalli più brevi o più lunghi. La durata può essere influenzata dalla quantità di tossina ingerita e, in generale, una maggiore esposizione può essere associata a una comparsa più precoce dei sintomi e a un quadro clinico più grave [57].

4.3 Botulismo infantile e altre forme intestinali

Il **botulismo infantile** è una forma di botulismo che colpisce soprattutto i bambini nei primi mesi di vita e può manifestarsi fino all'età di un anno. A differenza del botulismo alimentare, non è causato dall'ingestione di tossina già formata, ma dall'ingestione di spore di *Clostridium botulinum*. Una volta raggiunto l'intestino, le spore possono germinare, colonizzare il tratto intestinale e produrre la neurotossina direttamente nell'organismo [57,59].

Il botulismo infantile prende il nome dal fatto che colpisce soprattutto i lattanti, più suscettibili alla germinazione delle spore di *Clostridium botulinum* nell'intestino per l'imaturità della flora intestinale e dell'ambiente gastrointestinale. La flora batterica intestinale normalmente ostacola la crescita di *Clostridium botulinum*. Nei lattanti, però, il microbiota è ancora immaturo e questo rende più facile la germinazione delle spore e la colonizzazione dell'intestino. Con la crescita e la progressiva maturazione del

microbiota intestinale, la capacità delle spore di germinare e proliferare diminuisce [57,59].

Il contatto con le spore può avvenire nell'ambiente esterno o attraverso l'ingestione di alimenti. Le spore sono diffuse nell'ambiente e possono essere presenti nel terreno, nella polvere e nei sedimenti. Dall'altra parte, il miele rappresenta la fonte alimentare più conosciuta e documentata di esposizione alle spore di *Clostridium botulinum* nel lattante. Per questo motivo non deve essere somministrato ai bambini di età inferiore a 12 mesi (Fig 8A). Tuttavia, nella maggior parte dei casi non è possibile identificare con certezza la fonte dell'esposizione, che può essere anche di origine ambientale [59].

Dopo la produzione nell'intestino, la tossina viene assorbita e raggiunge le terminazioni nervose periferiche, dove interferisce con il rilascio di acetilcolina. La stipsi è spesso uno dei primi segni della malattia; possono successivamente comparire difficoltà nella suzione e nella deglutizione, pianto debole, ipotonia e debolezza muscolare (Fig. 8B). Nei casi più gravi può essere coinvolta anche la muscolatura respiratoria [59].



A



B

Figura 8. Il miele può contenere spore di C Botulinum (A) e causare un quadro di botulismo infantile (B).

Una forma simile, ma molto più rara, è il **botulismo da colonizzazione intestinale dell'adulto**. In questo caso le spore germinano e producono la tossina nell'intestino di soggetti che presentano condizioni in grado di alterare il normale ambiente gastrointestinale, come precedenti interventi chirurgici intestinali o importanti

modificazioni della flora batterica. Il meccanismo è quindi simile a quello del botulismo infantile, ma si verifica eccezionalmente nell'adulto [57].

4.4 Botulismo da ferita e altre forme rare

Il **botulismo da ferita** si sviluppa quando le spore di *Clostridium botulinum* contaminano una lesione cutanea o un tessuto danneggiato. Se nella sede della ferita si crea un ambiente povero di ossigeno, le spore possono germinare e trasformarsi nelle forme vegetative del batterio in grado di produrre la neurotossina direttamente nel tessuto. In questo modo la tossina passa poi nel circolo sanguigno e raggiunge le terminazioni nervose periferiche [57]. Il meccanismo è quindi diverso dal botulismo alimentare in quanto la tossina non viene ingerita già formata, ma viene prodotta direttamente all'interno della ferita.

Tra i principali fattori di rischio vi sono le ferite profonde o contaminate, soprattutto quando presentano tessuto necrotico o una ridotta ossigenazione. Negli ultimi anni molti casi sono stati osservati nelle persone che fanno uso di droghe per via parenterale, in particolare eroina. Il rischio aumenta quando la sostanza viene iniettata nel tessuto sottocutaneo, pratica nota come *skin popping*, oppure direttamente nel muscolo (*muscle popping*), perché queste modalità possono creare aree poco ossigenate nelle quali le spore riescono più facilmente a germinare [57,60].

Una particolare associazione è quella con la *black tar heroin*, una forma scura e viscosa di eroina storicamente diffusa soprattutto negli Stati Uniti. La sostanza può essere contaminata da spore di *C. botulinum* durante la produzione, il trasporto, la preparazione o la miscelazione con altre sostanze. Non è sempre possibile stabilire in quale fase avvenga la contaminazione.

Il periodo di incubazione del botulismo da ferita è generalmente più lungo rispetto a quello della forma alimentare: può variare da diversi giorni, fino a circa una o più settimane [57]. Dal punto di vista clinico, le manifestazioni neurologiche sono simili a quelle delle altre forme di botulismo, con interessamento dei nervi cranici, debolezza muscolare e paralisi flaccida discendente (Fig. 8). A differenza della forma alimentare, però, i disturbi gastrointestinali sono generalmente assenti. La ferita può mostrare segni di infezione locale, ma in alcuni casi può non essere evidente e quindi non essere riconosciuta come origine della malattia.

Tra le forme più rare rientra il **botulismo da inalazione**, dovuto all'assorbimento della tossina attraverso le vie respiratorie. Si tratta di una condizione eccezionale, descritta soprattutto in seguito a esposizioni accidentali in laboratorio. Dopo l'assorbimento, la

tossina raggiunge la circolazione e determina lo stesso blocco della trasmissione colinergica osservato nelle altre forme di botulismo [57].



Figura 8. Caso di botulismo da ferita in seguito alla contaminazione di una ferita traumatica (frattura braccio destro)

Un'altra forma rara è il **botulismo iatrogeno**, che può verificarsi dopo la somministrazione di tossina botulinica a scopo terapeutico o estetico. Normalmente l'azione della tossina rimane limitata alla sede di inoculo, ma raramente può diffondersi oltre il sito di somministrazione e determinare debolezza muscolare o manifestazioni sistemiche simili a quelle del botulismo [57].

4.5 Manifestazioni cliniche, complicanze e prognosi

Le manifestazioni cliniche del botulismo sono principalmente conseguenza del blocco del rilascio di acetilcolina a livello delle terminazioni nervose colinergiche. Nonostante le diverse modalità attraverso cui la tossina può raggiungere l'organismo, le principali forme di botulismo condividono quindi un quadro neurologico simile, caratterizzato soprattutto da una paralisi flaccida, simmetrica e progressiva con andamento discendente [57].

I primi disturbi interessano generalmente i nervi cranici. I pazienti possono presentare visione offuscata o doppia, ptosi palpebrale, difficoltà nei movimenti oculari e alterazioni della risposta pupillare. Possono inoltre comparire debolezza dei muscoli facciali,

difficoltà nel parlare e nel deglutire. L'interessamento dei muscoli della faringe può rendere difficile la gestione delle secrezioni e aumentare il rischio di aspirazione [57]. Con il progredire dell'intossicazione, la debolezza muscolare si estende in senso discendente, interessando il collo, gli arti superiori, il tronco e successivamente gli arti inferiori. La gravità del quadro è variabile con forme più lievi in cui sono coinvolti solo i nervi cranici a forme che coinvolgono gran parte della muscolatura volontaria. Il botulismo non altera lo stato di coscienza per cui il paziente rimane generalmente cosciente e lucido, anche in presenza di una marcata compromissione motoria [57]. La tossina può interessare anche il sistema nervoso autonomo. Possono quindi comparire secchezza delle fauci, riduzione della motilità intestinale con stipsi, ritenzione urinaria e alterazioni cardiovascolari, come variazioni della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa. La febbre è generalmente assente e, quando presente, può suggerire la presenza di un processo infettivo associato, come nel botulismo da ferita [57].

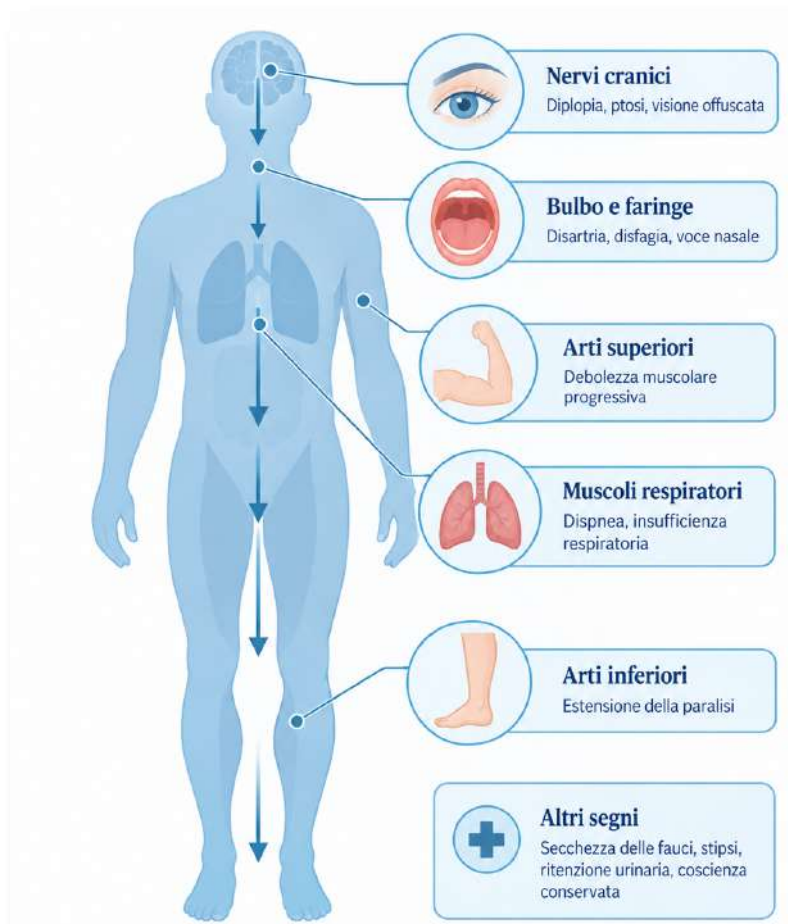


Figura 9. Principali manifestazioni cliniche del Botulismo.

Alcune manifestazioni possono variare in relazione alla forma di botulismo. Nel botulismo alimentare, per esempio, i sintomi neurologici possono essere preceduti da disturbi

gastrointestinali quali nausea, vomito, dolore addominale e talvolta diarrea. Nel botulismo infantile, invece, la stipsi è spesso uno dei primi segni e può essere seguita da difficoltà nella suzione, pianto debole, ipotonia e riduzione dei movimenti spontanei. Nel botulismo da ferita i sintomi gastrointestinali sono generalmente assenti [57,59].

La complicanza più grave è rappresentata dall'insufficienza respiratoria. La paralisi può infatti coinvolgere il diaframma e gli altri muscoli necessari alla respirazione, riducendo progressivamente la capacità ventilatoria. Anche la compromissione della deglutizione e dei riflessi di protezione delle vie aeree può contribuire al rischio respiratorio, favorendo l'aspirazione di secrezioni o materiale gastrico. Nei casi più gravi può rendersi necessaria l'intubazione e la ventilazione meccanica, che può essere prolungata per diverse settimane [57].

Il recupero dal botulismo è generalmente graduale e lento. L'antitossina può neutralizzare la tossina ancora libera nell'organismo, ma non è in grado di rimuovere quella che si è già legata alle terminazioni nervose. Il miglioramento clinico dipende quindi anche dal progressivo recupero della funzione delle terminazioni neuromuscolari. Nei casi più gravi possono essere necessarie settimane o mesi prima di ottenere un recupero completo [57].

La prognosi dipende dalla quantità di tossina assorbita, dalla gravità della compromissione neurologica e respiratoria, dalle condizioni generali del paziente e soprattutto dalla rapidità della diagnosi e dell'inizio del trattamento. Grazie alla disponibilità dell'antitossina e al miglioramento delle tecniche di supporto intensivo, in particolare della ventilazione meccanica, la mortalità si è notevolmente ridotta rispetto al passato. Tuttavia, il botulismo rimane una condizione potenzialmente letale e la diagnosi precoce ha un effetto positivo sulla prognosi [57].

IL BOTULISMO

Diagnosi, trattamento e prevenzione della malattia

5.1 Diagnosi clinica e differenziale

La diagnosi di botulismo è inizialmente clinica e si basa sul riconoscimento del caratteristico quadro neurologico e sulla raccolta di informazioni relative a possibili fonti di esposizione. La presenza di una paralisi flaccida, simmetrica e discendente, che inizia generalmente con il coinvolgimento dei nervi cranici, deve far sospettare la malattia, soprattutto quando lo stato di coscienza è conservato e non sono presenti disturbi sensitivi significativi [57,61].

Durante la valutazione del paziente è importante ricercare elementi che possano orientare verso una delle diverse forme di botulismo, facendo domande specifiche circa l'esposizione del paziente a possibili fonti di contagio. Nel sospetto di botulismo alimentare devono essere indagati il consumo recente di conserve o altri alimenti potenzialmente contaminati e l'eventuale presenza di sintomi simili in altre persone che abbiano consumato lo stesso alimento. Nel botulismo da ferita è invece importante ricercare lesioni cutanee, ferite profonde e l'eventuale uso di droghe per via iniettiva. Nel lattante, la presenza di stipsi, difficoltà nell'alimentazione, ipotonia e pianto debole può indirizzare verso il botulismo infantile [61]. L'assenza di una fonte evidente di esposizione, tuttavia, non permette di escludere la diagnosi.

L'esame neurologico ha quindi un ruolo centrale. Tra i segni più caratteristici vi sono **diplopia** (visione doppia), **ptosi** (abbassamento della palpebra superiore), **oftalmoplegia** (riduzione o paralisi dei movimenti oculari), **disfagia** (difficoltà nella deglutizione) e **disartria** (difficoltà nell'articolazione delle parole), ai quali può seguire una progressiva debolezza della muscolatura del collo, del tronco e degli arti. Nei casi più gravi viene coinvolta anche la muscolatura respiratoria. Gli esami neurologici devono essere ripetuti nel tempo, poiché la progressione della debolezza può essere rapida e la compromissione respiratoria può comparire anche dopo una fase iniziale apparentemente stabile [61].

La diagnosi può risultare difficile perché diverse patologie neurologiche presentano manifestazioni simili. Tra le principali condizioni da considerare vi sono la sindrome di Guillain-Barré, la miastenia gravis, la sindrome miastenica di Lambert-Eaton e alcune patologie del sistema nervoso centrale, come l'ictus del tronco encefalico [57,61]. Possono inoltre entrare nella diagnosi differenziale alcune intossicazioni e altre cause di paralisi flaccida.

Alcune caratteristiche cliniche possono aiutare nella distinzione. Nel botulismo la paralisi ha tipicamente un andamento discendente e simmetrico, con interessamento precoce dei nervi cranici e generalmente senza perdita della sensibilità [57,61].

Gli esami di laboratorio di routine e gli esami di imaging sono generalmente poco specifici. L'analisi del liquido cerebrospinale può essere utile soprattutto nella diagnosi differenziale con la sindrome di Guillain-Barré, mentre TC o risonanza magnetica cerebrale possono contribuire a escludere cause centrali, come un ictus cerebrovascolare. L'elettromiografia e gli studi di conduzione neuromuscolare possono fornire ulteriori elementi a sostegno della diagnosi nei casi dubbi [61].

La conferma definitiva richiede la dimostrazione della neurotossina botulinica o del microrganismo in campioni biologici o alimentari, ma il risultato degli esami specifici può richiedere diversi giorni. Per questo motivo, in caso di un quadro clinico fortemente suggestivo, la gestione del paziente e l'eventuale somministrazione dell'antitossina non devono essere ritardate in attesa della conferma di laboratorio [61].

5.2 Diagnosi microbiologica

La conferma di laboratorio del botulismo si basa sulla dimostrazione della neurotossina botulinica oppure sull'identificazione di microrganismi produttori di tossina nei campioni clinici o, nel caso del botulismo alimentare, nell'alimento sospetto. I campioni più utili dipendono dalla forma clinica: nel botulismo alimentare possono essere analizzati siero, feci, aspirato gastrico e residui dell'alimento sospetto; nel botulismo da ferita possono essere esaminati campioni prelevati dalla lesione; nelle forme da colonizzazione intestinale, invece, le feci hanno un ruolo particolarmente importante [61].

La raccolta dei campioni deve essere effettuata il più precocemente possibile. In particolare, il siero dovrebbe essere prelevato prima della somministrazione dell'antitossina, perché quest'ultima neutralizza la tossina circolante e può ridurre la possibilità di identificarla. La raccolta dei campioni non deve comunque ritardare l'inizio del trattamento quando il sospetto clinico è elevato [61].

Il metodo tradizionalmente considerato di riferimento per dimostrare l'attività biologica della tossina è il **Mouse Bioassay**, nel quale il campione viene somministrato all'animale e l'effetto viene valutato in presenza o assenza di antitossine specifiche (Fig. 10). Questo test consente di dimostrare la presenza di tossina biologicamente attiva, ma richiede laboratori specializzati, tempi relativamente lunghi e l'impiego di animali [61].



Fig.10 Mouse bioassay utilizzato per la ricerca della tossina botulinica biologicamente attiva

Altre metodiche più moderne sono i test immunologici, come **ELISA** che permettono di rilevare la tossina attraverso il riconoscimento antigenico, ma non sempre consentono di stabilire se la tossina rilevata sia biologicamente attiva. Le tecniche molecolari, in particolare la **PCR**, permettono invece di identificare i geni responsabili della produzione delle neurotossine botuliniche. La presenza del gene, tuttavia, non dimostra necessariamente che nel campione sia presente tossina attiva, per cui il risultato deve essere interpretato insieme agli altri dati microbiologici e clinici [61].

Nei laboratori di riferimento possono essere utilizzate anche metodiche basate sulla spettrometria di massa, come **Endopep-MS**, che sfruttano l'attività enzimatica specifica della neurotossina e permettono di identificarne alcuni sierotipi con elevata sensibilità e specificità. Si tratta tuttavia di tecniche disponibili soprattutto in centri altamente specializzati [61].

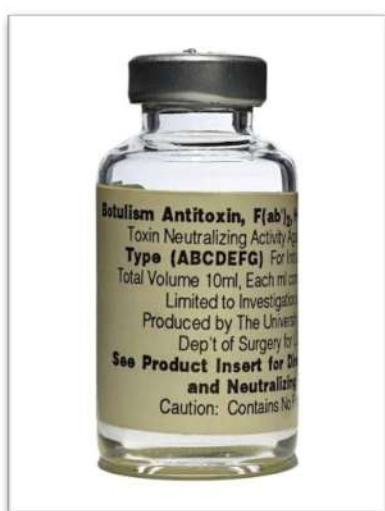
L'isolamento microbiologico può essere effettuato mediante coltura anaerobica di campioni come feci o materiale proveniente da una ferita. L'identificazione di *C. botulinum* o di altre specie produttrici di neurotossina, come *C. baratii* e *C. butyricum*, può contribuire alla conferma diagnostica. Questo aspetto è particolarmente importante nel botulismo infantile, nella colonizzazione intestinale dell'adulto e nel botulismo da ferita, nei quali il microrganismo può essere presente direttamente nell'organismo [61].

La negatività degli esami microbiologici non esclude completamente il botulismo. La quantità di tossina circolante tende infatti a diminuire con il tempo e, se i campioni vengono raccolti tardivamente, può diventare inferiore alla soglia di rilevazione. Per questo motivo la diagnosi rimane fortemente basata sul quadro clinico e il trattamento non deve essere posticipato nell'attesa della conferma di laboratorio [61].

5.3 Trattamento di supporto e terapia anti-tossinica

Il trattamento del botulismo si basa principalmente sulla somministrazione precoce dell'antitossina botulinica e sulle terapie di supporto necessarie in relazione alla gravità della malattia. L'antitossina rappresenta il trattamento specifico e agisce neutralizzando la tossina ancora libera nel circolo. Non è invece in grado di rimuovere la neurotossina già legata e internalizzata nelle terminazioni nervose; per questo motivo la somministrazione precoce dell'anti-tossina è fondamentale per limitare la progressione della paralisi [61].

Negli Stati Uniti, negli adulti e nei bambini di età superiore a un anno viene utilizzata principalmente l'antitossina **botulinica eptavalente di origine equina (BAT)**, attiva nei confronti dei sierotipi A, B, C, D, E, F e G (Fig. 11A). La preparazione contiene prevalentemente frammenti anticorpali Fab e F(ab')₂ ottenuti da immunoglobuline equine. La rimozione della porzione Fc consente di ridurre la reattogenicità rispetto alle immunoglobuline intere. I frammenti anticorpali si legano alla tossina botulinica ancora circolante, formando complessi che vengono successivamente eliminati dall'organismo.



A



B

Figura 11. Antitossina Botulinica eptavalente (A) e plasma di donatori immunizzati BabyBIG® usati negli USA per il trattamento del Botulismo

Poiché si tratta comunque di un prodotto di origine eterologa, possono verificarsi reazioni di ipersensibilità e, più raramente, reazioni allergiche gravi [61].

Nel botulismo infantile, sempre negli Stati Uniti, viene invece impiegata una preparazione specifica di immunoglobuline umane, indicata come **BIG-IV o BabyBIG®**, ottenuta da plasma di donatori immunizzati (Fig. 11B). Questa formulazione è utilizzata nei lattanti perché consente di neutralizzare la tossina circolante evitando l'impiego di preparazioni di origine equina. La somministrazione precoce può ridurre la durata della malattia e del ricovero [61].

In Italia, la gestione terapeutica è organizzata attraverso una rete che coinvolge le strutture ospedaliere, il *Ministero della Salute*, i *Centri Antiveleni* e il *Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB)* dell'Istituto Superiore di Sanità. Il CNRB fornisce supporto diagnostico e tecnico-scientifico 24 ore su 24 per tutto l'anno e indirizza i medici ospedalieri al magazzino dei prodotti profilattici del Ministero per il reperimento dell'antitossina e ai Centri Antiveleni per gli aspetti clinici e gestionali.

L'antitossina botulinica fa parte della **Scorta strategica Nazionale Antidoti e Farmaci (SNAF)** e può essere mobilitata rapidamente verso gli ospedali che ne fanno richiesta. La disponibilità e le modalità di approvvigionamento della preparazione delle immunoglobuline umane (**BabyBIG®**) nel botulismo infantile, differiscono da quelle dell'antitossina equina e richiedono il coinvolgimento di centri specialistici e delle strutture competenti.

Accanto alla terapia specifica, il trattamento comprende misure di supporto. Nei casi più gravi può essere necessario un supporto respiratorio, anche mediante ventilazione meccanica, fino al progressivo recupero della funzione neuromuscolare. Tale recupero può richiedere diverse settimane o mesi, poiché dipende dalla rigenerazione funzionale delle terminazioni nervose danneggiate dalla tossina [61].

Il trattamento clinico non è concentrato in un unico ospedale nazionale specializzato nel botulismo. Il paziente viene generalmente gestito nella struttura ospedaliera più adeguata alla gravità del quadro, con disponibilità di terapia intensiva e ventilazione meccanica nei casi con compromissione respiratoria. Il CNRB rappresenta quindi il principale riferimento nazionale per la diagnosi, la sorveglianza e il coordinamento tecnico-scientifico, mentre la gestione clinica delle complicanze avviene nei centri ospedalieri dotati delle competenze e delle risorse necessarie.

Gli antibiotici non hanno un ruolo nel botulismo alimentare, poiché non agiscono sulla tossina già presente nell'organismo. Nel botulismo da ferita, invece, possono essere utilizzati insieme al trattamento locale della lesione e allo sbrigliamento del tessuto contaminato, quando indicato. Nel botulismo infantile l'impiego di antibiotici non è generalmente raccomandato in assenza di altre infezioni, poiché la lisi dei microrganismi intestinali potrebbe teoricamente favorire un ulteriore rilascio di tossina [61].

Particolare attenzione deve essere posta anche ai farmaci che possono interferire con la trasmissione neuromuscolare. Gli aminoglicosidi, ad esempio, possono ridurre ulteriormente il rilascio di acetilcolina e aggravare la debolezza muscolare. Anche il magnesio e alcuni farmaci ad azione miorilassante devono essere utilizzati con cautela nei pazienti affetti da botulismo [61].

Nel complesso, l'efficacia del trattamento dipende soprattutto dalla rapidità del riconoscimento della malattia e dalla precoce somministrazione dell'antitossina. La terapia specifica può arrestare la progressione dell'intossicazione, ma non corregge immediatamente il blocco neuromuscolare già instaurato; per questo motivo il recupero clinico può essere lento anche dopo la neutralizzazione della tossina circolante [61].

5.4 Prevenzione del botulismo alimentare e casi di attualità

La prevenzione del botulismo alimentare si basa soprattutto sull'impedire la germinazione delle spore di *Clostridium botulinum* e la successiva produzione di neurotossina negli alimenti. Questo aspetto assume particolare importanza in Italia, dove la preparazione domestica di conserve è molto diffusa e continua a rappresentare una delle principali situazioni associate ai casi di botulismo alimentare. Secondo i dati dell'Istituto Superiore di Sanità, tra il 1986 e il settembre 2022 sono stati confermati in laboratorio 406 incidenti di botulismo in Italia, con 599 persone coinvolte. Tali dati confermano che le conserve vegetali sott'olio rappresentavano la categoria più frequentemente implicata [56,62].

Le principali misure preventive riguardano:

- ✓ **Corretta igiene** - nella preparazione domestica delle conserve, la prima misura preventiva è rappresentata dall'impiego di materie prime sane e accuratamente lavate, insieme a una corretta igiene delle mani, degli utensili e dei contenitori. La contaminazione iniziale non può essere completamente evitata, perché le spore sono ampiamente diffuse nell'ambiente; è quindi fondamentale creare condizioni che ne impediscano la germinazione e la produzione della tossina [62].
- ✓ **pH della conserva** - uno dei parametri più importanti è il pH. I clostridi produttori di tossine botuliniche non riescono normalmente a svilupparsi in alimenti sufficientemente acidi; per questo motivo le conserve con pH inferiore a 4,6 sono considerate protette nei confronti della crescita di *C. botulinum*. In ambito domestico, tuttavia, poiché la misurazione del pH può non essere precisa, le linee guida italiane consigliano di mantenere un margine di sicurezza e raggiungere

valori inferiori a circa 4. L'acidificazione può essere ottenuta, a seconda della preparazione, utilizzando aceto o succo di limone nelle quantità previste da ricette validate [62]. Particolare attenzione deve essere posta alle conserve sott'olio, perché l'olio crea un ambiente povero di ossigeno che, in presenza di un alimento non sufficientemente acidificato, può favorire la germinazione delle spore. I vegetali destinati alla conservazione sott'olio devono quindi essere sottoposti a un'adeguata acidificazione prima dell'invasettamento.

- ✓ **Acqua libera** - un altro fattore importante è la quantità di acqua libera disponibile nell'alimento. La riduzione dell'attività dell'acqua mediante aggiunta di sale o zucchero può impedire la crescita del microrganismo. Le linee guida dell'ISS indicano come riferimento un valore di attività dell'acqua inferiore a circa 0,93-0,935. Per questo motivo preparazioni correttamente formulate come marmellate e confetture ad elevato contenuto di zucchero, prodotti sott'aceto e alcune salamoie presentano un rischio molto inferiore rispetto alle conserve vegetali poco acide sott'olio o in acqua [62]. Tuttavia, le preparazioni in salamoia devono rispettare concentrazioni saline sufficienti: l'ISS indica, per esempio, circa 100 g di sale per litro d'acqua per olive e prodotti analoghi [62].
- ✓ **Trattamento termico** - è importante distinguere la distruzione della tossina dalla distruzione delle spore. La neurotossina botulinica è relativamente sensibile al calore, mentre le spore sono molto più resistenti e non vengono eliminate da una comune bollitura domestica. La sterilizzazione efficace delle conserve poco acide richiede temperature intorno a 121 °C, ottenute con vapore sotto pressione e secondo tempi adeguatamente validati. Per questo motivo l'ISS sconsiglia la produzione domestica di conserve di carne o pesce quando non è possibile applicare procedure di sterilizzazione sicure [62].
- ✓ **Conservazione** - anche il corretto confezionamento e la conservazione dopo la preparazione sono importanti. I contenitori devono essere integri e correttamente chiusi, e il raggiungimento del vuoto deve essere controllato dopo il trattamento termico. La presenza di coperchi rigonfi, perdita di liquido, produzione di gas o altre alterazioni deve indurre a scartare la conserva. Tuttavia, l'assenza di anomalie visibili non garantisce la sicurezza, perché la tossina botulinica può essere presente senza modificare in modo evidente odore, sapore o aspetto dell'alimento. Per questo motivo non è corretto assaggiare una conserva sospetta per verificarne la sicurezza [62].
- ✓ **Catena del freddo** - un'attenzione particolare deve essere riservata anche alla catena del freddo. Alcuni alimenti refrigerati a lunga conservazione possono sostenere la crescita di ceppi di *C. botulinum* se non vengono mantenuti costantemente alle temperature indicate. Il rispetto delle modalità di

conservazione riportate in etichetta è quindi parte integrante della prevenzione, soprattutto per prodotti pronti al consumo o confezionati sottovuoto [62].

Gli episodi storici di botulismo alimentare mostrano bene come errori diversi possano portare allo stesso risultato. Nel Regno Unito, nel 1989, si verificò il più grande focolaio di botulismo alimentare allora registrato nel Paese, con 27 persone coinvolte e un decesso (Fig. 12). Venticinque pazienti avevano consumato yogurt alla nocciola prodotto con una conserva di nocciole dolcificata con aspartame anziché zucchero. Le indagini dimostrarono la presenza di tossina botulinica di tipo B e indicarono che il trattamento della conserva non era stato sufficiente a distruggere le spore [63].

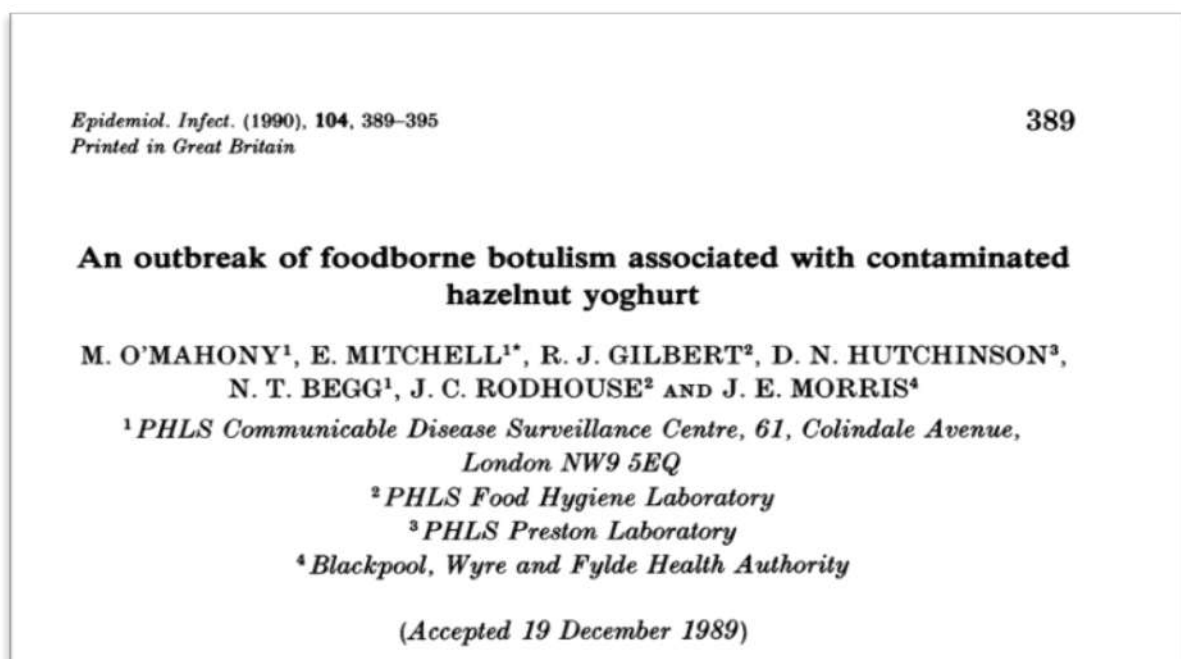


Figura 11. Articolo originale del 1990 sul caso di Botulismo alimentare da yoghurt alla nocciola

Un episodio particolarmente rilevante per l'Italia si verificò nel 1996, quando un focolaio di botulismo fu associato al consumo di mascarpone commerciale, utilizzato anche nella preparazione del tiramisù (Fig. 12). Otto giovani furono coinvolti; tutti presentarono una forma grave e necessitarono di ventilazione meccanica, e un paziente morì. Le indagini identificarono la tossina botulinica di tipo A nel prodotto e indicarono come probabile fattore favorente una interruzione della catena del freddo, che avrebbe consentito la germinazione delle spore e la produzione della tossina [64].

Questi eventi hanno avuto anche conseguenze sul piano della sicurezza alimentare. Dopo il focolaio italiano del 1996 furono introdotte misure specifiche nella produzione del mascarpone, tra cui procedure volte a ridurre la contaminazione da spore e l'impiego di

sostanze capaci di limitarne la crescita, mostrando come l'analisi epidemiologica di un focolaio possa portare a modifiche concrete dei processi produttivi [64].



Figura 12. Articolo originale sul focolaio italiano di botulismo alimentare da mascarpone

Nell'estate 2025 il Ministero della Salute ha segnalato due importanti cluster di intossicazione botulinica in Sardegna e Calabria, che hanno richiesto l'attivazione dei protocolli sanitari nazionali e della rete della Scorta Strategica Nazionale Antidoti e Farmaci (Fig.13). L'ISS ha svolto un ruolo centrale nella conferma diagnostica e nell'analisi degli alimenti sospetti, mentre la distribuzione degli antidoti è stata coordinata attraverso la rete nazionale. Il Ministero ha richiamato in quell'occasione l'attenzione soprattutto sulle conserve preparate sottovuoto, in olio o in acqua e sull'importanza del rispetto delle corrette procedure di conservazione [65].

Gli episodi del 2025 hanno inoltre determinato un'intensificazione dei controlli sulla sicurezza alimentare, soprattutto in ambito di street food, sagre e produzioni artigianali. Nella seconda metà dell'agosto 2025, per esempio, i NAS di Bologna hanno sequestrato 674 kg di conserve e succhi di frutta presso un'azienda agricola nella quale erano state rilevate procedure di pastorizzazione considerate inadeguate a garantire la sicurezza microbiologica dei prodotti.



Figura 13. Comunicato stampa del Ministero della Salute sui cluster di intossicazione botulinica nel 2025.

Questi casi confermano che, nonostante il botulismo sia una patologia rara, la prevenzione conserva un ruolo fondamentale. Una corretta preparazione domestica delle conserve, il rispetto dei parametri di acidità, concentrazione di sale o zucchero, trattamento termico e refrigerazione, insieme a sistemi efficaci di sorveglianza e controllo degli alimenti, rappresentano ancora oggi gli strumenti principali per ridurre il rischio di botulismo alimentare.

DALLA TOSSINA AL FARMACO

Applicazioni terapeutiche della neurotossina botulinica

6.1 Dalla neurotossina naturale al farmaco

La neurotossina botulinica rappresenta un esempio particolare di come una sostanza estremamente tossica possa essere trasformata, attraverso la purificazione e il controllo della dose, in un importante strumento terapeutico. L'azione paralizzante della tossina era già stata descritta nell'Ottocento da Justinus Kerner, che ne aveva ipotizzato un possibile impiego terapeutico. Tuttavia, solo nel corso del Novecento la progressiva conoscenza del suo meccanismo d'azione ha permesso di svilupparne l'utilizzo farmacologico [66,67].

I primi studi clinici moderni risalgono agli anni Settanta, quando la tossina botulinica di tipo A venne sperimentata per ridurre selettivamente l'attività dei muscoli extraoculari nei pazienti affetti da strabismo. I risultati positivi portarono progressivamente all'impiego della tossina in altre condizioni caratterizzate da una contrazione muscolare eccessiva. Nel 1989 negli Stati Uniti fu autorizzato il primo prodotto farmaceutico contenente tossina botulinica di tipo A per il trattamento di strabismo e blefarospasmo. Negli anni successivi le indicazioni terapeutiche si ampliarono rapidamente alla distonia cervicale, alla spasticità e a numerose altre condizioni [66].

Il passaggio dalla tossina naturale al medicinale richiede produzione controllata, isolamento, purificazione e standardizzazione dell'attività biologica. Le preparazioni farmaceutiche vengono ottenute da colture di ceppi produttori di neurotossina e successivamente sottoposte a processi specifici di purificazione. La quantità di tossina impiegata a scopo terapeutico è estremamente ridotta e viene somministrata localmente nel tessuto bersaglio, permettendo di ottenere un effetto circoscritto e reversibile [67].

Tra i diversi sierotipi conosciuti, quelli utilizzati nella pratica terapeutica sono principalmente **BoNT/A** e **BoNT/B**. La tossina di tipo A è nettamente la più impiegata, grazie alla durata relativamente prolungata dell'effetto e alla vasta esperienza clinica accumulata. La tossina di tipo B viene utilizzata solo in specifiche situazioni cliniche [66,67].

L'utilizzo della neurotossina botulinica si è così progressivamente esteso oltre le patologie caratterizzate da iperattività muscolare. L'inibizione della trasmissione colinergica può infatti essere sfruttata anche per ridurre l'attività di alcune ghiandole esocrine, come nel trattamento dell'iperidrosi e della scialorrea, e per modulare alcuni

meccanismi coinvolti nella percezione del dolore, come nel caso dell'emicrania cronica [66,68].

6.2 Preparazioni farmaceutiche e caratteristiche principali

Le preparazioni contenenti neurotossina botulinica sono **medicinali biologici** e non semplici soluzioni della tossina pura. I diversi prodotti possono differire per ceppo batterico di origine, processo produttivo, metodo di purificazione, presenza di proteine associate alla neurotossina, eccipienti e metodo utilizzato per determinare l'attività biologica [69].

Tra le formulazioni maggiormente utilizzate a livello internazionale vi sono tre preparazioni di tossina botulinica di tipo A:

1. **onabotulinumtoxinA**, commercializzata principalmente come **Botox®**;
2. **abobotulinumtoxinA**, commercializzata come **Dysport®**;
3. **incobotulinumtoxinA**, commercializzata come **Xeomin®**.

È disponibile inoltre una formulazione di tossina botulinica di tipo B, **rimabotulinumtoxinB**, commercializzata in alcuni Paesi come **Myobloc®** o **NeuroBloc®** [66,69].

Questi prodotti non presentano una composizione completamente identica. Alcune formulazioni contengono, oltre alla neurotossina da 150 kDa, proteine batteriche associate derivate dal complesso naturale, mentre altre, come incobotulinumtoxinA, contengono essenzialmente la neurotossina purificata priva delle proteine complessanti. Anche gli eccipienti impiegati per garantire stabilità durante produzione, conservazione e ricostituzione possono essere differenti [66,69].

Un concetto particolarmente importante dal punto di vista farmaceutico è che le unità di attività biologica delle diverse formulazioni non sono direttamente intercambiabili. L'unità non rappresenta infatti una quantità espressa in massa, ma un valore di attività biologica determinato mediante saggi specifici del produttore. Di conseguenza, 100 unità di un prodotto non possono essere considerate automaticamente equivalenti a 100 unità di un'altra preparazione. Ogni medicinale deve quindi essere utilizzato secondo la propria scheda tecnica e con il dosaggio previsto per la specifica formulazione [69].

Le differenze tra i prodotti riguardano anche le indicazioni autorizzate. Non tutte le formulazioni possiedono infatti le stesse autorizzazioni terapeutiche o estetiche, che possono inoltre variare tra Stati Uniti, Unione Europea e singoli Paesi. Per questo motivo il nome commerciale "Botox" non dovrebbe essere utilizzato come sinonimo generale di tossina botulinica: Botox® rappresenta una specifica formulazione di

onabotulinumtoxinA, mentre esistono numerosi altri medicinali a base di neurotossina botulinica [66,69].

Molte preparazioni di BoNT/A sono commercializzate sotto forma di polvere da ricostituire prima dell'iniezione. La ricostituzione, la conservazione e il periodo di utilizzo dopo preparazione devono seguire le indicazioni previste per ogni singolo prodotto. Questi aspetti sono rilevanti perché la tossina è una proteina biologicamente attiva e una manipolazione non corretta può modificarne stabilità e attività.

6.3 Meccanismo d'azione nell'uso terapeutico

Nel utilizzo terapeutico della neurotossina botulinica viene sfruttato lo stesso processo responsabile della paralisi osservata nel botulismo, ma in maniera localizzata, controllata e reversibile (Fig. 14).

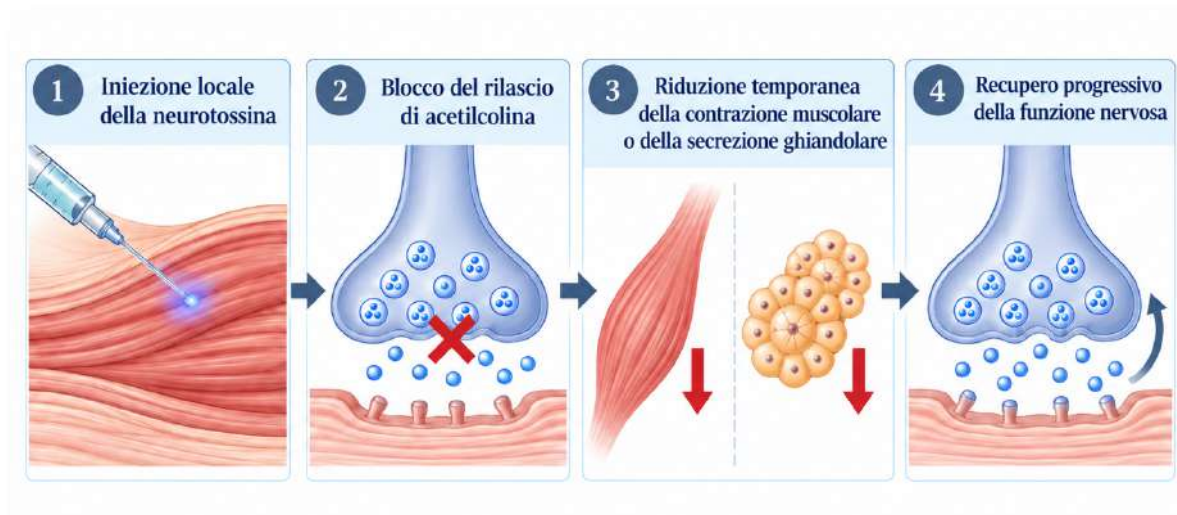


Figura 14. Meccanismo farmacologico nell'uso terapeutico della neurotossina botulinica.

Dopo l'iniezione nel tessuto bersaglio, la neurotossina si lega selettivamente alle terminazioni nervose colinergiche e viene internalizzata mediante endocitosi. La catena leggera raggiunge il citoplasma della terminazione nervosa e agisce come proteasi zinco-dipendente sulle proteine del complesso **SNARE**, fondamentali per la fusione delle vescicole contenenti neurotrasmettitori con la membrana presinaptica [67,68].

La **BoNT/A** determina principalmente la scissione della proteina **SNAP-25**, impedendo il rilascio di acetilcolina. A livello della giunzione neuromuscolare questo determina una riduzione temporanea della contrazione del muscolo trattato. La **BoNT/B** agisce invece

prevalentemente sulla ***sinaptobrevina/VAMP***, ottenendo comunque come risultato finale l'inibizione dell'esocitosi del neurotrasmettitore [67].

L'effetto farmacologico rimane prevalentemente circoscritto alla zona trattata e non determina normalmente una paralisi generalizzata alle dosi terapeutiche. Dopo un periodo variabile la funzione neuromuscolare viene progressivamente recuperata attraverso il ripristino dell'apparato di rilascio dell'acetilcolina e la riorganizzazione delle terminazioni nervose [67,68].

L'effetto non è quindi permanente. Per molte preparazioni di tipo A la durata clinica è in genere dell'ordine di alcuni mesi, anche se varia in relazione alla formulazione, alla dose, all'indicazione, al tessuto trattato e alle caratteristiche individuali del paziente [66].

L'azione della neurotossina non è limitata alla giunzione neuromuscolare ma può agire anche a livello del sistema nervoso autonomo. Inoltre, la tossina botulinica può interferire con il rilascio di mediatori coinvolti nella trasmissione nocicettiva ossia degli stimoli dolorosi. Questo meccanismo viene considerato importante per spiegare l'efficacia della onabotulinumtoxinA nella profilassi dell'emicrania cronica, effetto che non può essere attribuito esclusivamente al rilassamento muscolare [68].

6.4 Principali applicazioni terapeutiche

L'impiego terapeutico della neurotossina botulinica si è progressivamente esteso a diverse aree della medicina. Le principali applicazioni sfruttano tre effetti farmacologici (Fig. 15):

- 1> riduzione dell'attività muscolare;
- 2> riduzione delle secrezioni ghiandolari;
- 3> modulazione della trasmissione del dolore.

I principali ambiti di medicina in cui si usa la neurotossina a scopo terapeutico sono:

- ⇒ **In ambito neurologico**, la tossina botulinica è utilizzata soprattutto nelle patologie caratterizzate da contrazioni muscolari involontarie o aumento del tono muscolare. Tra le indicazioni più consolidate vi sono la distonia cervicale, il blefarospasmo, lo spasmo emifacciale e diverse forme di spasticità. L'iniezione nei muscoli interessati determina una riduzione selettiva della contrazione, consentendo di diminuire l'iperattività muscolare senza produrre una paralisi sistemica [66].

Un'altra indicazione importante è la profilassi dell'emicrania cronica. L'onabotulinumtoxinA viene somministrata in specifici punti della muscolatura cranica e cervicale secondo protocolli prestabiliti. In questo contesto l'effetto terapeutico è collegato anche alla riduzione del rilascio periferico di mediatori coinvolti nella nocicezione e nella sensibilizzazione del sistema trigeminale [68].

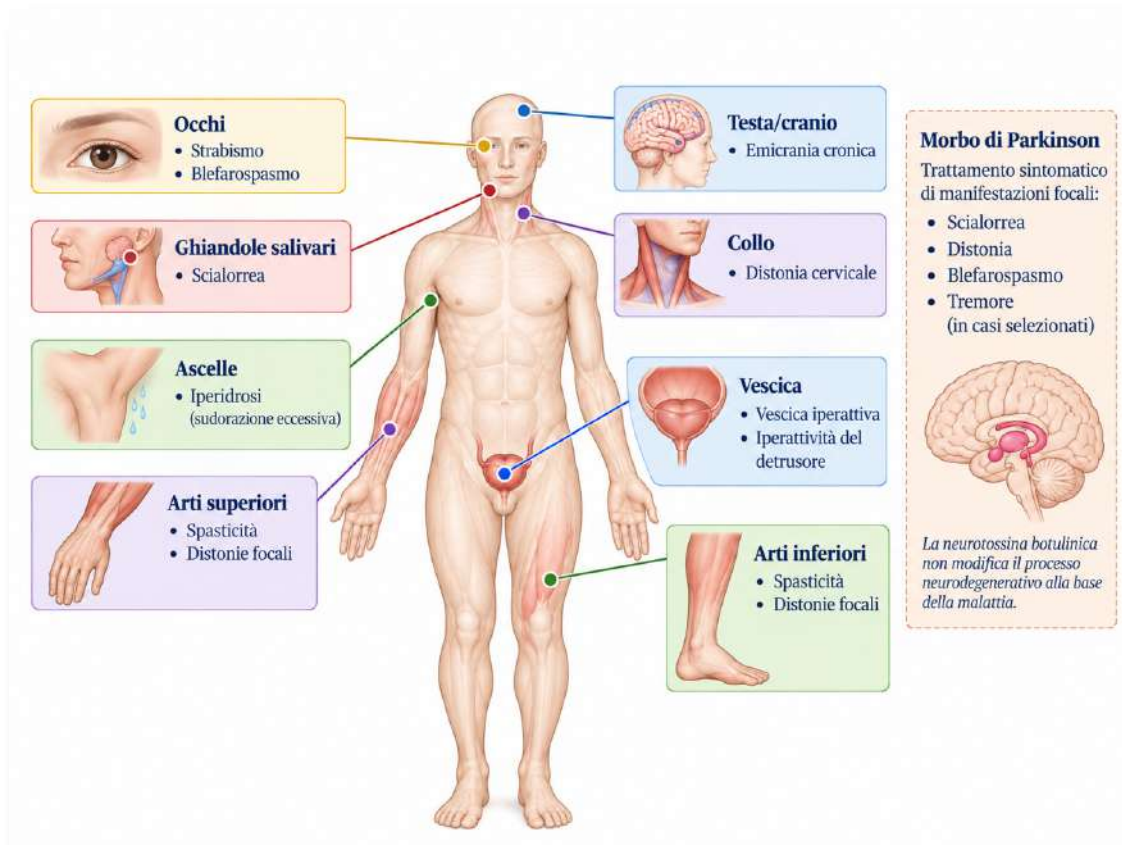


Figura 15. Principali applicazioni terapeutiche della neurotossina botulinica

Nel morbo di Parkinson la neurotossina botulinica non modifica il processo neurodegenerativo alla base della malattia, ma può essere utilizzata come trattamento sintomatico di alcune manifestazioni motorie e non motorie, soprattutto se si tratta di disturbi di distretti ben definiti che possono essere trattati localmente [71,72]. Una delle applicazioni più consolidate è il trattamento della scialorrea, frequente nei pazienti con Parkinson e dovuta soprattutto alla ridotta frequenza della deglutizione e alla difficoltà nel controllo della saliva, più che a una sua reale iperproduzione. L'iniezione della tossina botulinica nelle ghiandole salivari, principalmente parotidi e sottomandibolari, blocca temporaneamente il rilascio di acetilcolina dalle terminazioni parasimpatiche e determina una riduzione

della secrezione salivare [73]. L'utilizzo locale della tossina può rappresentare un vantaggio rispetto ai farmaci anticolinergici sistemici, che possono determinare effetti indesiderati quali secchezza delle fauci, stipsi, ritenzione urinaria e disturbi cognitivi, particolarmente rilevanti nei pazienti anziani. L'effetto della tossina non è permanente e tende generalmente a mantenersi per alcuni mesi, rendendo necessarie somministrazioni periodiche nei pazienti che rispondono al trattamento. Un'altra applicazione importante riguarda le distonie focali associate alla malattia di Parkinson. Possono interessare diverse regioni corporee e, in particolare, gli arti inferiori: la distonia del piede può manifestarsi con flessione o estensione involontaria delle dita, inversione del piede o altre posture anomale. L'iniezione selettiva nei muscoli maggiormente coinvolti può ridurre la contrazione involontaria e migliorare dolore e funzione motoria [71,72].

- ⇒ **In ambito oftalmologico**, l'utilizzo della tossina botulinica ha rappresentato una delle prime applicazioni terapeutiche. L'iniezione nei muscoli extraoculari può correggere temporaneamente alcune forme di strabismo, mentre l'iniezione nei muscoli perioculari viene utilizzata nel blefarospasmo, caratterizzato da contrazioni involontarie delle palpebre [66].
- ⇒ **In ambito urologico** la neurotossina botulinica viene usata soprattutto nel trattamento della vescica iperattiva e dell'iperattività neurogena del detrusore. L'iniezione nella parete vescicale riduce il rilascio di acetilcolina dalle terminazioni parasimpatiche, diminuendo l'eccessiva contrazione del muscolo detrusore e contribuendo al controllo dell'urgenza e dell'incontinenza urinaria.
- ⇒ **In ambito dermatologico** e più nello specifico in relazione alle ghiandole esocrine abbiamo un'altra applicazione della tossina. Quest'ultima, ha effetto sulle terminazioni colinergiche che controllano le ghiandole esocrine. Nell'iperidrosi (sudorazione eccessiva), l'iniezione intradermica riduce la stimolazione delle ghiandole sudoripare e quindi la produzione di sudore. Il trattamento è utilizzato soprattutto nell'iperidrosi ascellare severa quando gli interventi locali convenzionali non sono sufficienti [66]. La tossina può inoltre essere impiegata nella scialorrea, riducendo temporaneamente la secrezione delle ghiandole salivari.

6.5 Uso della neurotossina botulinica in medicina estetica

L'utilizzo estetico della neurotossina botulinica deriva dallo stesso principio farmacologico impiegato nelle indicazioni terapeutiche: la riduzione temporanea della contrazione dei muscoli sottostanti la cute. Le cosiddette rughe dinamiche si formano infatti soprattutto per la contrazione ripetuta della muscolatura mimica; diminuendo temporaneamente questa attività muscolare, la tossina rende le linee cutanee meno evidenti (Fig.16) [66].



Figura 16. Effetto prima e dopo il trattamento estetico con tossina botulinica nelle rughe

La scoperta dell'effetto estetico fu in parte conseguenza dell'utilizzo della tossina nel trattamento del blefarospasmo, quando venne osservato che i pazienti sottoposti alle iniezioni presentavano anche una riduzione delle rughe periorculari. Nel 2002 la FDA

autorizzò negli Stati Uniti l'utilizzo cosmetico della onabotulinumtoxinA per il trattamento temporaneo delle linee glabellari. Successivamente le indicazioni estetiche sono state ampliate ad altre aree del volto e sono state introdotte ulteriori formulazioni [66].

Le zone maggiormente trattate comprendono le linee glabellari, localizzate tra le sopracciglia, le rughe frontali e le linee periorcolari laterali, comunemente indicate come "zampe di gallina". L'effetto non è permanente e tende progressivamente a diminuire con il recupero della funzione neuromuscolare, rendendo necessarie nuove somministrazioni per mantenere il risultato.

Anche nell'ambito estetico è fondamentale distinguere le diverse formulazioni disponibili. OnabotulinumtoxinA, abobotulinumtoxinA e incobotulinumtoxinA non sono prodotti identici e le rispettive unità non devono essere considerate intercambiabili [69]. Gli effetti indesiderati più comuni sono generalmente locali e transitori e comprendono dolore, eritema, edema o piccoli ematomi nella sede di iniezione e cefalea. Quando la tossina diffonde verso muscoli vicini a quelli trattati possono invece comparire effetti funzionali indesiderati, come ptosi palpebrale, ptosi del sopracciglio o asimmetria facciale [70].

La crescente diffusione dell'impiego estetico rende particolarmente importante l'utilizzo di medicinali autorizzati, correttamente conservati e somministrati da personale sanitario qualificato. L'impiego di prodotti contraffatti, non autorizzati o di provenienza non controllata aumenta il rischio di errori di dosaggio e di effetti sistemici.

6.6 Sicurezza, controindicazioni ed effetti avversi

Quando viene utilizzata alle dosi previste e somministrata correttamente, la neurotossina botulinica presenta generalmente un buon profilo di sicurezza. Gli eventi avversi dipendono tuttavia da diversi fattori, tra cui:

- × formulazione;
- × dose;
- × sede di iniezione;
- × tecnica utilizzata e caratteristiche del paziente [66,70].

Gli effetti indesiderati più frequenti sono generalmente circoscritti alla sede di somministrazione e comprendono dolore, eritema, edema, ecchimosi e debolezza temporanea dei muscoli vicini. La natura dell'effetto indesiderato dipende dal distretto trattato: per esempio, le iniezioni nella regione periorcolare possono determinare ptosi o

diplopia, mentre il trattamento della muscolatura cervicale può essere associato a debolezza del collo o difficoltà nella deglutizione [70].

Più raramente l'effetto farmacologico può estendersi oltre il sito di iniezione. In questi casi possono comparire sintomi compatibili con un eccessivo blocco della trasmissione neuromuscolare, tra cui debolezza generalizzata, disfagia, disartria e difficoltà respiratoria. Si tratta di eventi rari, ma particolarmente importanti perché ricordano, dal punto di vista fisiopatologico, le manifestazioni del botulismo.

L'impiego della tossina richiede particolare cautela nei pazienti affetti da patologie della giunzione neuromuscolare, come la **miastenia gravis**, poiché la riduzione della trasmissione colinergica può accentuare la debolezza muscolare. Anche la presenza di infezione nel sito previsto per l'iniezione o una precedente reazione di ipersensibilità al prodotto rappresentano condizioni da considerare prima della somministrazione.

Devono inoltre essere valutate possibili interazioni farmacologiche. I farmaci capaci di interferire con la trasmissione neuromuscolare, in particolare gli aminoglicosidi, possono potenziare l'azione della tossina. Analoga cautela è necessaria con altri medicinali o sostanze capaci di ridurre il rilascio di acetilcolina o di modificare la funzione neuromuscolare.

Un ulteriore aspetto è la possibile formazione di anticorpi neutralizzanti nei confronti della neurotossina. Si tratta di un fenomeno poco frequente, ma può contribuire alla riduzione della risposta terapeutica dopo trattamenti ripetuti. Il rischio può essere influenzato dalla formulazione, dalla quantità di proteina somministrata, dalla dose totale e dalla frequenza delle somministrazioni [66].

Dal punto di vista della sicurezza farmaceutica è inoltre essenziale ricordare che le unità delle diverse formulazioni non sono intercambiabili. Un errore nella conversione tra prodotti può determinare sottodosaggio o sovradosaggio e modificare sia l'efficacia sia il rischio di eventi avversi [69].

Infine, bisogna porre particolare attenzione anche alla provenienza del prodotto. Quando la vendita e la commercializzazione dei prodotti avviene attraverso canali non autorizzati, c'è il rischio di utilizzare preparazioni contraffatte o non registrate (Fig. 17).



Figura 17. Esempio di confronto tra una confezione autentica e una contraffatta di Botox® pubblicato dalla FDA nel 2015.

In questi casi, i prodotti possono contenere concentrazioni non note e aumentare il rischio di botulismo iatrogeno.

Ad oggi, c'è stata una importante diffusione dei trattamenti estetici, aumentando sempre di più l'attenzione verso il riconoscimento di prodotti che possono essere poco efficaci e potenzialmente dannosi. Un esempio significativo è rappresentato dalla Food and Drug Administration (FDA), che svolge un'attività continua di sorveglianza e comunicazione sui prodotti contraffatti a base di tossina botulinica, pubblicando segnalazioni, immagini comparative e informazioni utili al riconoscimento delle confezioni sospette. L'obiettivo di queste segnalazioni è quello di sensibilizzare professionisti sanitari e consumatori sui rischi associati all'uso di prodotti non autorizzati.

IL RUOLO DEL FARMACISTA

7.1 Il farmacista nella prevenzione e nell'educazione sanitaria

Il ruolo del farmacista non riguarda solo la dispensazione dei medicinali, ma comprende anche attività di prevenzione, educazione sanitaria e informazione al cittadino. In Italia, lo sviluppo della farmacia dei servizi ha rafforzato questa funzione, dando alle farmacie territoriali un ruolo sempre più importante nelle attività di prevenzione e nella diffusione di informazioni sanitarie corrette [74].

Il farmacista è infatti uno dei professionisti sanitari più presenti sul territorio e con cui la popolazione può entrare più facilmente in contatto. Difatti, il contatto diretto con il cittadino permette di chiarire dubbi, correggere informazioni poco affidabili e favorire comportamenti più consapevoli, soprattutto quando le informazioni vengono cercate autonomamente su internet o sui social media.

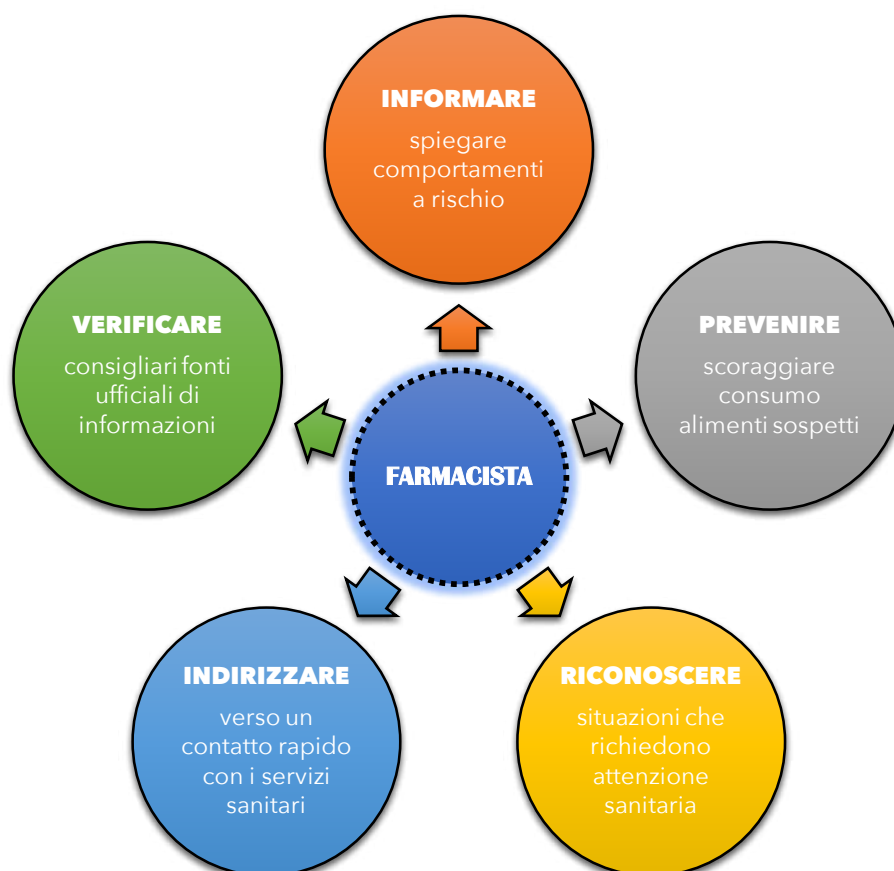


Figura 18. Principali modalità attraverso cui il farmacista contribuisce alla comunicazione del rischio.

Nel caso del botulismo, il farmacista può contribuire soprattutto alla comunicazione del rischio. Il farmacista, può richiamare l'attenzione sui pericoli legati alla preparazione e alla conservazione non corretta degli alimenti, ricordare di non consumare prodotti sospetti e indirizzare il cittadino verso fonti ufficiali, come quelle dell'Istituto Superiore di Sanità e del Ministero della Salute [62].

Un altro aspetto importante riguarda il riconoscimento delle situazioni che richiedono una valutazione medica. In presenza di sintomi neurologici comparsi dopo il consumo di un alimento sospetto, il farmacista non deve formulare una diagnosi, ma può capire che è necessario un contatto rapido con i servizi sanitari, evitando che il problema venga sottovalutato o trattato come un semplice disturbo gastrointestinale.

L'attività educativa del farmacista non consiste quindi solo nel dare informazioni, ma anche nel selezionare fonti affidabili, usare un linguaggio chiaro e indirizzare il cittadino verso il percorso sanitario più adatto. In questo modo, il farmacista può rappresentare un punto di collegamento importante tra popolazione, servizi sanitari e autorità di sanità pubblica.

7.2 Gestione dei medicinali a base di tossina botulinica

I medicinali a base di neurotossina botulinica richiedono una gestione attenta, perché si tratta di farmaci biologici ad elevata attività, disponibili in formulazioni differenti e con indicazioni specifiche. Il farmacista deve quindi conoscere le caratteristiche principali del prodotto dispensato e fare riferimento al *Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto (RCP)* e al foglio illustrativo, documenti ufficiali che riportano informazioni aggiornate su indicazioni, sicurezza, controindicazioni, modalità di conservazione e precauzioni d'impiego [75]. L'AIFA sottolinea che questi documenti vengono aggiornati nel tempo in base alle nuove informazioni disponibili sulla sicurezza e sull'efficacia dei medicinali.

Un aspetto fondamentale riguarda la corretta identificazione della formulazione. Le diverse preparazioni di tossina botulinica non devono essere considerate equivalenti tra loro e le unità di attività biologica non sono direttamente intercambiabili. Per questo motivo il farmacista deve verificare con attenzione nome del medicinale, principio attivo, dosaggio e formulazione, evitando sostituzioni improprie [69]. Anche il RCP di Botox® specifica che le unità utilizzate per esprimerne la potenza sono proprie di quel prodotto e non possono essere trasferite ad altre preparazioni di tossina botulinica.

La corretta gestione comprende anche il rispetto delle condizioni di conservazione e delle modalità di ricostituzione previste per ogni medicinale. Queste possono variare tra

i diversi prodotti e devono essere seguite secondo quanto riportato nella scheda tecnica. Ad esempio, alcune formulazioni devono essere conservate a temperatura controllata e, dopo la ricostituzione, devono essere utilizzate entro un periodo definito [76].

Il farmacista svolge inoltre un ruolo importante nell'informazione al paziente, chiarendo che i diversi prodotti non sono tra loro identici e che la scelta della formulazione, della dose e della sede di somministrazione spetta al medico sulla base dell'indicazione clinica. È utile anche ricordare che il trattamento deve essere effettuato da personale sanitario qualificato e con medicinali provenienti da canali autorizzati.

In questo ambito, il contributo del farmacista riguarda quindi soprattutto la corretta gestione del medicinale, la verifica del prodotto e la diffusione di informazioni precise e aggiornate, elementi che contribuiscono a ridurre il rischio di errori e a garantire un impiego più sicuro della tossina botulinica.

7.3 Farmacovigilanza e sicurezza

La farmacovigilanza comprende tutte le attività finalizzate a individuare, valutare e prevenire le reazioni avverse e gli altri problemi legati all'uso dei medicinali. Il controllo della sicurezza non termina quindi con l'autorizzazione all'immissione in commercio, ma continua durante tutto il periodo di utilizzo del farmaco [77].

In Italia, le segnalazioni di sospette reazioni avverse vengono raccolte attraverso la **Rete Nazionale di Farmacovigilanza (RNF)** e contribuiscono alla sorveglianza continua dei medicinali. I dati confluiscono anche nel sistema europeo **EudraVigilance**, che permette la raccolta e l'analisi delle segnalazioni provenienti dai diversi Paesi europei e facilita l'individuazione di possibili segnali di sicurezza (Fig. 19) [77,78].

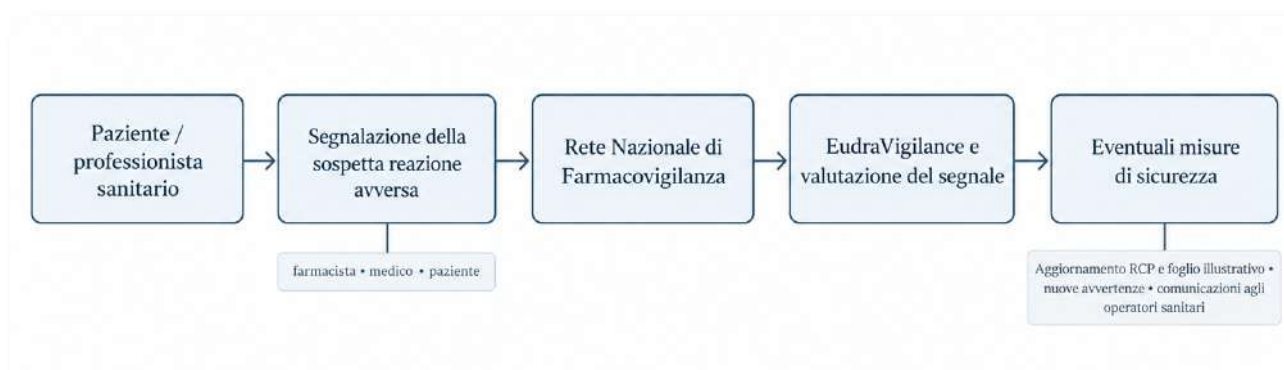


Figura 19. Schema semplificato della segnalazione di farmacovigilanza

Il farmacista può avere un ruolo importante in questo processo perché può riconoscere una possibile reazione avversa, raccogliere informazioni sul medicinale utilizzato e favorire la segnalazione. Non è necessario avere la certezza che il farmaco abbia causato l'evento: anche una sospetta associazione può essere utile per la farmacovigilanza, soprattutto quando viene analizzata insieme ad altre segnalazioni.

Nel caso dei medicinali a base di tossina botulinica, la sorveglianza è particolarmente importante perché, oltre agli effetti locali più comuni, possono verificarsi eventi dovuti alla diffusione dell'effetto della tossina oltre il sito di iniezione causando un quadro di botulismo iatrogeno che può a sua volta richiedere una valutazione medica entro breve termine.

Un esempio recente dell'importanza della farmacovigilanza riguarda le procedure europee di revisione periodica della sicurezza della tossina botulinica. Nel 2025, il Comitato di valutazione dei rischi per la farmacovigilanza dell'EMA ha raccomandato l'aggiornamento delle informazioni di prodotto di alcune preparazioni di tossina botulinica di tipo A, introducendo un'avvertenza più esplicita sul rischio di botulismo iatrogeno e sui sintomi compatibili con una diffusione sistemica della tossina [79]. Questo rappresenta un esempio concreto di come i dati raccolti dopo l'immissione in commercio possano portare a modifiche del Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto e del foglio illustrativo (Fig.20).



Figura 20. Esempio di procedura europea di farmacovigilanza relativa alla tossina botulinica tipo A.

Un altro esempio, proveniente dagli Stati Uniti, riguarda i casi segnalati nel 2024 dopo l'utilizzo di prodotti contraffatti a base di tossina botulinica. La FDA ha riportato eventi avversi, inclusi ricoveri ospedalieri, con sintomi come diplopia, disfagia, debolezza muscolare e difficoltà respiratoria. Questi episodi hanno portato a un'attività di sorveglianza, segnalazione tramite il sistema MedWatch e diffusione di informazioni rivolte sia ai professionisti sanitari sia ai cittadini [80].

Il ruolo del farmacista non consiste quindi soltanto nel riconoscere una possibile reazione avversa, ma anche nel raccogliere informazioni utili sul prodotto utilizzato, sulla dose, sul momento della somministrazione e sulla comparsa dei sintomi. Una segnalazione completa rende infatti più efficace la valutazione del caso e può contribuire all'identificazione di nuovi problemi di sicurezza.

7.4 Contrasto all'uso improprio e ai prodotti contraffatti

L'aumento dell'uso della tossina botulinica, soprattutto in ambito estetico, ha reso più importante il controllo della provenienza e dell'autenticità dei medicinali. I prodotti acquistati attraverso canali non autorizzati possono essere falsificati, non registrati, conservati in modo non corretto oppure contenere quantità di principio attivo diverse da quelle dichiarate. In questi casi non è possibile garantire qualità, efficacia e sicurezza [80]. L'AIFA definisce falsificato un medicinale che presenta informazioni false riguardo alla propria identità, origine o tracciabilità. Un prodotto falsificato può contenere lo stesso principio attivo del medicinale originale, quantità diverse, sostanze differenti oppure non contenere affatto il principio attivo dichiarato. Il rischio deriva quindi sia dalla composizione non controllata sia dalla produzione e distribuzione al di fuori degli standard previsti per i medicinali autorizzati [80].

Per la tossina botulinica questo problema assume particolare importanza, perché piccole differenze nella quantità o nell'attività biologica possono modificare in modo rilevante l'effetto del trattamento. Inoltre, come già descritto, le unità utilizzate per le diverse formulazioni non sono direttamente intercambiabili. L'impiego di un prodotto di composizione o concentrazione incerta può quindi aumentare il rischio di sovradosaggio, diffusione sistemica dell'effetto e botulismo iatrogeno.

Un esempio concreto è rappresentato dai casi segnalati dalla FDA negli Stati Uniti nel 2024. L'autorità ha identificato confezioni e flaconcini contraffatti di Botox utilizzati per finalità estetiche, alcuni dei quali erano stati acquistati attraverso fonti non autorizzate. Sono stati riportati anche ricoveri ospedalieri e sintomi compatibili con la diffusione

sistemica della tossina, tra cui diplopia, disfagia, debolezza muscolare e difficoltà respiratoria [81].

La FDA ha inoltre indicato alcuni elementi utili per riconoscere i prodotti sospetti, come dosaggi non commercializzati dal produttore originale, numeri di lotto anomali o denominazioni del principio attivo differenti da quelle presenti sulle confezioni autorizzate. Queste segnalazioni mostrano l'importanza della tracciabilità del medicinale e dell'acquisto esclusivamente attraverso canali autorizzati [81].

Anche in Italia il contrasto ai medicinali falsificati comprende attività di controllo sulla produzione, distribuzione e vendita attraverso siti web non autorizzati. AIFA sottolinea che l'acquisto di medicinali da canali non ufficiali espone il cittadino al rischio di prodotti di qualità non verificata e privi delle garanzie previste dalla normativa farmaceutica [80]. In questo contesto il farmacista può contribuire alla sicurezza attraverso la verifica della provenienza del medicinale, della confezione, del lotto, della scadenza e delle corrette condizioni di conservazione. Può inoltre informare il cittadino sui rischi dell'acquisto di prodotti iniettabili attraverso siti non autorizzati e ricordare che la tossina botulinica deve essere utilizzata all'interno di un percorso sanitario controllato.

Un ulteriore compito riguarda la segnalazione di prodotti sospetti. Quando emergono dubbi sull'autenticità, sulla qualità o sulla provenienza di un medicinale, il farmacista può contribuire all'attivazione dei sistemi di segnalazione previsti dalle autorità competenti. Il contrasto alla contraffazione diventa quindi parte della tutela del paziente e della sicurezza della filiera farmaceutica.

In sintesi, nel caso dei farmaci a base di neurotossina botulinica, il farmacista può avere un ruolo importante nella protezione di chi ne fa uso attraverso il controllo sulla corretta provenienza del farmaco, attraverso l'informazione sull'uso appropriato del medicinale e attraverso la segnalazione dei prodotti che sono risultati sospetti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il botulismo rappresenta ancora oggi una patologia rara ma di particolare importanza per la gravità delle sue possibili conseguenze. La capacità di *Clostridium botulinum* di produrre spore resistenti e neurotossine estremamente potenti spiega la necessità di mantenere alta l'attenzione sulla prevenzione, sulla corretta conservazione degli alimenti e sul riconoscimento precoce dei casi sospetti. Nonostante i progressi nella diagnosi e nel trattamento, la rapidità di intervento rimane infatti un elemento fondamentale per ridurre il rischio di complicanze.

Uno degli aspetti più interessanti è la duplice natura della neurotossina botulinica. La stessa sostanza responsabile della paralisi caratteristica del botulismo, se purificata, standardizzata e utilizzata a dosi controllate, può diventare un farmaco efficace. La conoscenza sempre più precisa del suo meccanismo d'azione ha permesso di sviluppare numerose applicazioni terapeutiche, soprattutto in ambito neurologico, ma anche in oftalmologia, urologia, dermatologia e medicina estetica. Questo passaggio da tossina a medicinale rappresenta un esempio significativo di come la ricerca microbiologica e farmacologica possa trasformare un agente potenzialmente pericoloso in uno strumento terapeutico di grande utilità.

Allo stesso tempo, l'aumento dell'impiego della tossina botulinica rende sempre più importante mantenere elevati standard di sicurezza, appropriatezza e controllo della qualità. Le diverse formulazioni disponibili non sono direttamente intercambiabili e richiedono una corretta gestione, conservazione e utilizzazione. A questo si aggiunge il problema dei prodotti contraffatti o provenienti da canali non autorizzati, che può aumentare il rischio di eventi avversi anche gravi. La farmacovigilanza assume quindi un ruolo essenziale per individuare nuovi segnali di sicurezza e aggiornare nel tempo le informazioni relative ai medicinali.

In questo contesto, il farmacista può contribuire in diversi momenti: attraverso l'educazione sanitaria e la prevenzione del botulismo alimentare, attraverso la corretta gestione dei medicinali e attraverso la segnalazione delle sospette reazioni avverse.

Guardando al futuro, è probabile che le applicazioni della neurotossina botulinica continuino ad ampliarsi. La ricerca è orientata verso nuove indicazioni terapeutiche, formulazioni più selettive e strategie capaci di prolungarne o modulare l'effetto, mantenendo al tempo stesso un elevato profilo di sicurezza. Sarà quindi importante accompagnare questi sviluppi con una continua attività di ricerca, sorveglianza e corretta informazione. La neurotossina botulinica rimane così un esempio particolarmente

interessante di come una stessa molecola possa rappresentare, a seconda del contesto, sia un importante rischio per la salute sia una risorsa terapeutica di grande valore.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare sinceramente il Professor Pietro Grisoli, per la disponibilità, il supporto e i consigli ricevuti durante la stesura di questa tesi.

Un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, per avermi sempre sostenuto e incoraggiato durante questo percorso universitario. Grazie per la fiducia, la pazienza e per essermi stata accanto in ogni momento.

A tutti voi dedico questo importante traguardo.

Ringrazio anche i miei amici, per aver condiviso con me momenti di gioia e di difficoltà, rendendo questo percorso più leggero e ricco di bei ricordi.

BIBLIOGRAFIA

1. Erbguth, F. J. (2004). *Historical notes on botulism, Clostridium botulinum, and botulinum toxin*. Movement Disorders, 19(S8), S2-S6.
2. Kerner, J. (1822). *Das Fettgift oder die Fettsäure und ihre Wirkungen auf den thierischen Organismus*. Cotta, Stuttgart.
3. Peck, M. W. (2009). *Biology and genomic analysis of Clostridium botulinum*. Advances in Microbial Physiology, 55, 183-320.
4. Erbguth, F. J., & Naumann, M. (1999). *Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786-1862) and the "sausage poison"*. Neurology, 53(8), 1850-1850.
5. Pearce, J. M. S. (2005). *Justinus Kerner (1786-1862) and botulism*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 76(2), 170-170.
6. Snipe, P. T., & Sommer, H. (1928). *Studies on botulinus toxin. 3. Acid precipitation of botulinus toxin*. Journal of Infectious Diseases, 43(2), 152-160.
7. Torrens, J. K. (1998). *Clostridium botulinum was named because of sausage poisoning*. BMJ, 317(7152), 181.
8. Van Ermengem, E. (1897). *Ueber einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus*. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten, 26(1), 1-56.
9. Devriese, L. A. (1999). *Émile Pierre van Ermengem (1851-1932) and the discovery of Clostridium botulinum*. Anaerobe, 5(3-4), 113-115.
10. Sobel, J. (2005). *Botulism*. Clinical Infectious Diseases, 41(8), 1167-1173.
11. Bengtson, I. A. (1924). *Studies on organisms concerned as causative agents in botulism*. Hygienic Laboratory Bulletin, 136, 1-101.
12. Schantz, E. J., & Johnson, E. A. (1992). *Properties and use of botulinum toxin and other microbial neurotoxins in medicine*. Microbiological Reviews, 56(1), 80-99.
13. Burgen, A. S. V., Dickens, F., & Zatman, L. J. (1949). *The action of botulinum toxin on the neuro-muscular junction*. The Journal of Physiology, 109(1-2), 10-24.
14. Scott, A. B., Rosenbaum, A., & Collins, C. C. (1973). *Pharmacologic weakening of extraocular muscles*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 12(12), 924-927.
15. Scott, A. B. (1980). *Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus*. Transactions of the American Ophthalmological Society, 78, 384.
16. Scott, A. B. (1981). *Botulinum toxin injection into extraocular muscles as an alternative to strabismus surgery*. Ophthalmology, 88(12), 1255-1264.

17. US Food and Drug Administration (FDA). (1989). *Approval summary for OnabotulinumtoxinA (Botox)*.
18. Bushara, K. O., & Park, D. M. (1993). *Botulinum toxin and sweating*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 56(12), 1339-1340.
19. Carruthers, A., & Carruthers, J. (2002). *History of the cosmetic use of botulinum A exotoxin*. Dermatologic Surgery, 28(11), 1011-1014.
20. Parte, A. C., et al. (2020). *LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature*. Nucleic Acids Research, 48(D1), D613-D618.
21. Cato, E. P., George, W. L., & Finegold, S. M. (1986). *Genus Clostridium Prazmowski 1880*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 1141-1200...
22. Sobel, J. (2005). *Botulism*. Clinical Infectious Diseases, 41(8), 1167-1173
23. Smith, L. D. (1977). *Botulism: The Organism, Its Toxins, the Disease*. Charles C Thomas Publisher.
24. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). *Medical Microbiology*. Elsevier Health Sciences.
25. Setlow, P. (2006). *Spore resistance properties*. Microbiology Spectrum, 4(5).
26. Johnson, E. A. (2007). *Clostridium botulinum*. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 401-421.
27. Lindström, M., & Korkeala, H. (2006). *Safety of historical and modern poultry products in relation to Clostridium botulinum*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 5(1), 18-30.
28. Setlow, P. (2006). *Spore resistance properties*. Microbiology Spectrum, 4(5).
29. Peck, M. W. (2009). *Biology and genomic analysis of Clostridium botulinum*. Advances in Microbial Physiology, 55, 183-320.
30. Stumbo, C. R. (2013). *Thermobacteriology in food processing*. Elsevier.
31. Russell, A. D. (1990). *Bacterial spores and chemical disinfectant agents*. Clinical Microbiology Reviews, 3(2), 99-119.
32. Wells-Bennik, M. H., et al. (2016). *Bacterial spores in food: germination, survival, and control*. Food Microbiology, 53, 2-12.
33. Johnson, E. A. (2007). *Clostridium botulinum*. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 401-421.
34. Ministero della Salute / ISS. (2014). *Linee guida per la corretta preparazione delle conserve alimentari in ambito domestico*.
35. Peck, M. W. (2009). *Biology and genomic analysis of Clostridium botulinum*. Advances in Microbial Physiology, 55, 183-320.
36. Graham, A. F., et al. (1997). *Growth of non-proteolytic Clostridium botulinum at low temperatures*. Letters in Applied Microbiology, 24(5), 357-361.

37. Anniballi, F., et al. (2013). Botulism in Europe: evolution of the disease in the period 2006–2010. *Eurosurveillance*, 18(3), 20361.
38. Anniballi, F., et al. (2013). *Ecological distribution of Clostridium botulinum spores in Italian soils*. *International Journal of Food Microbiology*, 164(2-3), 168-173.
39. Hill, K. K., et al. (2007). Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *Journal of Bacteriology*, 189(3), 818-832.
40. Espelund, M., & Klaveness, D. (2014). Botulism outbreaks in natural environments. *Frontiers in Microbiology*, 5, 287.
41. Popoff, M. R. (2018). Clostridial neurotoxins: more diversity than expected. *Toxins*, 10(9), 351.
42. Neimanis, A., et al. (2018). Epidemiology of type C and D botulism in wild birds and mammals. *Veterinary Microbiology*, 222, 10-18.
43. Suen, J. C., et al. (1988). *Clostridium argentinense* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38(4), 375-381.
44. Barash, J. R., & Arnon, S. S. (2014). A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type H botulinum neurotoxin. *The Journal of Infectious Diseases*, 209(2), 183-191.
45. Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum neurotoxins: biology, pharmacology, and toxicology. *Pharmacol Rev.* 2017;69(2):200-235. doi:10.1124/pr.116.012658.
46. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, et al. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins (Basel)*. 2017;9(1):38. doi:10.3390/toxins9010038.
47. Rossetto, O., Pirazzini, M., & Montecucco, C. (2014). *Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses*. *Nature Reviews Neurology*, 10(9), 530-537.
48. Lacy, D. B., & Stevens, R. C. (1999). *Sequence and structural homology of the botulinum neurotoxins*. *Journal of Molecular Biology*, 291(5), 1091-1104.
49. Fischer, A., & Montal, M. (2007). *Crucial role of the disulfide bond between heavy and light chains of botulinum neurotoxin type A in translocation*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(41), 29604-29611.
50. Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol Rev.* 2017;69(2):200-235. doi:10.1124/pr.116.012658.
51. Fujinaga Y, Sugawara Y, Matsumura T. Uptake of botulinum neurotoxin in the intestine. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;364:45-59. doi:10.1007/978-3-642-33570-9_3.

52. Rummel A. *Double receptor anchorage of botulinum neurotoxins accounts for their exquisite neurospecificity*. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;364:61-90. doi:10.1007/978-3-642-33570-9_4.
53. Rossetto O, Pirazzini M, Montecucco C. *Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights*. Nat Rev Microbiol. 2014;12(8):535-549. doi:10.1038/nrmicro3295.
54. Botulism in the 21st Century: A Scoping Review. Cureus. Review della letteratura dedicata a epidemiologia, forme cliniche, diagnosi e trattamento del botulismo.
55. Anniballi F, et al. Botulism in Italy, 1986 to 2015. Euro Surveill. 2017;22(24):30550. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.24.30550.
56. Anniballi F, et al. Botulism in Italy, 1986 to 2015. Euro Surveill. 2017;22(24):30550. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.24.30550.
57. Rasetti-Escargueil C, Lemichez E, Popoff MR. *Pathogenicity and virulence of Clostridium botulinum*. Virulence. 2023;14(1):2205251.
58. Peck MW, et al. *Physical Treatments to Control Clostridium botulinum Hazards in Food*. Foods. 2023.
59. Harris RA, et al. *Infant Botulism: In Search of Clostridium botulinum Spores*. Curr Microbiol. 2024. Review recente e molto utile perché tratta proprio le fonti delle spore, il miele, l'esposizione ambientale e la colonizzazione intestinale.
60. Kalka-Moll WM, Aurbach U, Schaumann R, Schwarz R, Seifert H. *Wound botulism in injection drug users*. Emerg Infect Dis. 2007;13(6):942-943.
61. Rao AK, Sobel J, Chatham-Stephens K, Luquez C. *Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Botulism, 2021*. MMWR Recomm Rep. 2021;70(2):1-30. doi:10.15585/mmwr.rr7002a1.
62. Istituto Superiore di Sanità. *Linee guida per la corretta preparazione delle conserve alimentari in ambito domestico*. Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo, ISS; 2016.
63. O'Mahony M, Mitchell E, Gilbert RJ, et al. An outbreak of foodborne botulism associated with contaminated hazelnut yoghurt. Epidemiol Infect. 1990;104(3):389-395. doi:10.1017/S0950268800047403.
64. Aureli P, Di Cunto M, Maffei A, et al. An outbreak in Italy of botulism associated with a dessert made with mascarpone cream cheese. Eur J Epidemiol. 2000;16(10):913-918. doi:10.1023/A:1011002401014.
65. Ministero della Salute. *Botulino, attivati immediatamente protocolli sanitari per cluster in Sardegna e Calabria*. Comunicato stampa, 8 agosto 2025.
66. Dressler D, Johnson EA. *Botulinum toxin therapy: past, present and future developments*. J Neural Transm (Vienna). 2022;129(5-6):829-833. doi:10.1007/s00702-022-02494-5.

67. Pirazzini M, Montecucco C, Rossetto O. *Toxicology and pharmacology of botulinum and tetanus neurotoxins: an update*. Arch Toxicol. 2022;96(6):1521-1539. doi:10.1007/s00204-022-03271-9.
68. Brin MF, Burstein R. *Botox (onabotulinumtoxinA) mechanism of action*. Medicine (Baltimore). 2023;102(Suppl):e32372. doi:10.1097/MD.00000000000032372.
69. Brin MF, James C, Maltman J. *Botulinum toxin type A products are not interchangeable: a review of the evidence*. Biologics. 2014;8:227-241. doi:10.2147/BTT.S65603.
70. Di Santis EP, Hirata SH, Di Santis GM, Yarak S. *Adverse effects of the aesthetic use of botulinum toxin and dermal fillers on the face: a narrative review*. An Bras Dermatol. 2025;100(1):87-103. doi:10.1016/j.abd.2024.04.007.
71. Jost WH, et al. *Use of Botulinum Neurotoxin in Parkinson's Disease: A Critical Appraisal*. Toxins (Basel). 2021;13(2):87. doi:10.3390/toxins13020087.
72. Slouha E, Ibrahim F, Esposito S, Mursuli O. *Botulinum Toxin for the Management of Parkinson's Disease: A Systematic Review*. Cureus. 2024;16(1):e53309. doi:10.7759/cureus.53309.
73. Isaacson J, Patel S, Torres-Yaghi Y. *Sialorrhea in Parkinson's Disease*. Toxins (Basel). 2020;12(11):691. doi:10.3390/toxins12110691.
74. Ministero della Salute. *Farmacia dei servizi / educazione sanitaria e prevenzione*.
75. Agenzia Italiana del Farmaco. *Riassunto delle Caratteristiche del Prodotto e Foglio Illustrativo*.
76. Riassunti delle Caratteristiche del Prodotto delle formulazioni a base di tossina botulinica.
77. Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA). *Farmacovigilanza e Rete Nazionale di Farmacovigilanza*.
78. European Medicines Agency (EMA). *EudraVigilance*. Sistema europeo per la raccolta e l'analisi delle segnalazioni di sospette reazioni avverse.
79. European Medicines Agency (EMA). *Botulinum toxin A - PSUSA/00000426/202412*. Aggiornamento delle informazioni di sicurezza, 2025.
80. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Counterfeit Version of Botox Found in Multiple States*. 2024