



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Botulismo umano e animale. Diagnosi di laboratorio

29 novembre 2016

Metodiche alternative al modello animale (mouse test) D.Lgs.vo 26/2014

Paola De Santis

Direzione Operativa Controllo degli Alimenti

Laboratorio Biotecnologie Applicate alla Sicurezza Alimentare



Da cosa origina il modello animale

Ricerca clinica basata sull'osservazione → Ippocrate IV sec A.C.

Inizio studio del corpo umano → Galeno Claudio di Pergamo 200 D.C.

La chiesa condanna la pratica autoptica perché Immorale, si cominciano ad utilizzare gli animali
500 testi pubblicati e conclusioni spesso errate

1° Trattato di anatomia umana "ANATHOMIA" → Mondino dei Liuzzi 1200

Non accettato dalla comunità scientifica perché immorale

Università di Basilea → Paracelso 1400-1500 Licenziato, distrusse i testi di Galeno

Studi autoptici sul corpo umano → Leonardo da Vinci e Andrea Vesalio 1400-1500

Condanna per eresia per aver dimostrato che uomo e donna hanno stesso numero di costole



Fondazione delle Università di Bologna e Padova → **Rinascimento**

Animali utilizzati per capire il funzionamento
degli organismi viventi **Harvey** (1600) sistema sanguigno
Pavlov (1800-1900) apparato digerente

Sperimentazione animale sancita da **Claude Bernard** (1800) →

Persuade la comunità scientifica:
malattia dell'uomo non riproducibile
negli animali non esiste

1a Società Antivivisezionista → **George Hoggan** (1875) studente di Bernard ammette
che molti degli esperimenti condotti erano non
necessari e inutili. Ma l'utilizzo degli animali continua
per la facilità di accesso e mancanza di vincoli etici

USA 1938 Normativa che obbliga le ditte farmaceutiche a provare i farmaci sugli
animali a causa della morte, nel 1937, di 137 persone per la
somministrazione di un antibiotico in diethylene glycol. Il farmaco provato
sugli animali si confermò letale. Nel 1951 tale obbligo esteso a tutte le
sostanze chimiche



OGGI

Russell & Burch: 3Rs



Russell, W. M. S. and Burch, R. L. 1959. The principles of humane experimental technique

Anni 80. Senso morale nei confronti degli animali contrapposto all'antropocentrismo. Tom Regan pubblica testi filosofici sui diritti degli animali e David Smyth un approccio scientifico a metodi alternativi e più innovativi.

Anni 50. Charles Hume incarica due ricercatori dell'Universities Federation for Animal Welfare di approfondire la possibilità di fare esperimenti in modo UMANO

Anni 60. Nasce il concetto di metodo alternativo e si diffondono i criteri delle 3R di Russell e Burch

Anni 70. La comunità scientifica acquisisce maggiore responsabilità morale nei confronti degli animali e del loro benessere, tuttavia il loro utilizzo è ancora considerato indispensabile.

ERA DELLE RIFORME 1980-2010.
Emissione di normative per la protezione degli animali e ricerca dei metodi alternativi



Direttiva 2010/63/EU e Legge 26 del 4 marzo 2014

Obiettivo finale

**Completa eliminazione dell'uso
degli animali nella
sperimentazione**

Pone le basi per la protezione degli animali in sperimentazione

Sancisce che:

Se metodi alternativi disponibili → No animali **3R → Replacement**

Numero minimo di animali → Ma significativo STATISTICA **3R → Reduction**

Animali a più basso sviluppo evolutivo **3R → Refinement**

Massima riduzione di dolore, sofferenza stress per gli animali **3R → Refinement**



Stabilisce inoltre:

VALUTAZIONE dei progetti di ricerca:	Concetto di VALUTAZIONE ETICA del danno/beneficio. Istituzione OPBA (Organismo Preposto al Benessere Animale) ISS-CSS-MINSAL
ALTA FORMAZIONE del personale	DM sulla base di EU Quadro Comune di Istruzione e Formazione
RENDICONTAZIONE dei risultati ottenuti	Valutazione retrospettiva ISS-CSS
ADOZIONE RAPIDA dei metodi alternativi	ECVAM (European Commission for the Validation of Alternative Methods) 2011 presso JRC, Ispra, Italia EU-NETVAL (EU Network of Laboratories for the Validation of Alternative Methods) gestito da ECVAM
ISTITUZIONE del Centro Nazionale di Riferimento per i metodi alternativi	Istituto Zooprofilattico Sp. Lombardia e Emilia Romagna IZSLER
VALUTAZIONE PERIODICA progetti	Commissione Europea per l'efficacia delle misure adottate. Prevista nel 2017 e nel 2019



Il principio delle 3R

Replacement (Sostituzione)

Parziale:

- Embrioni o stadi fetali
- Daphnidi
- Colture cellulari, colture di tessuto, modelli 3D, bioreattori

Assoluta:

- Studi epidemiologici su volontari
- Modelli computerizzati



Il principio delle 3R

Reduction (Riduzione)

Riduzione del numero degli animali utilizzati
garantendo comunque risultati attendibili mediante lo
studio statistico

Allo scopo di:

- Evitare duplicazioni
- Saggi in vitro per individuare tempi e dosi prima dell'utilizzo degli animali
- Ottimizzazione del disegno sperimentale



Il principio delle 3R

Refinement (Perfezionamento)

Alleviare o minimizzare la sofferenza e il dolore

Mediante:

- Migliori condizioni di stabulazione
- Manipolazione accurata degli animali da personale esperto
- Migliorare la vita degli animali con arricchimento ambientale
- Annullare la necessità di ripetere l'esperimento



Metodi alternativi nella legislazione

Regolamento REACH n°1907/2006. Protezione dell'uomo e dell'ambiente. Riguarda le sostanze chimiche e stabilisce che le informazioni sulla tossicità devono essere acquisite ove possibile senza ricorrere all'uso degli animali.

Regolamento CLP n°1272/2008. Il Regolamento riprende i principi del Globally Harmonized System (GHS) delle Nazioni Unite indirizzato verso una classificazione ed etichettatura armonizzate a livello mondiale.

Regolamento biocidi n° 528/2012. Gestito dall'European Chemical Agency (ECHA).

Questi tre regolamenti stabiliscono l'obbligo comune di condividere informazioni sui principi attivi e sui prodotti approvati e autorizzati nell'UE.

Per evitare nuovi test sugli animali è fatto obbligo alle industrie di condividere i dati sperimentali esistenti sui vertebrati.



Metodi alternativi per l'identificazione di tossine botuliniche

Specifico

Sensibile

Veloce

In grado di rilevare tossina **attiva**

“Mouse test” o “Mouse bioassay” è sviluppato nel 1927 dal farmacologo inglese J. W. Trevenan, è ancora il “gold standard”, ma è possibile applicare il principio delle **3R**



Neurotossine di clostridi

- TeNT

- *Clostridium tetani*

BoNTs 8 sierogruppi: A-B-E-F-G-C-D-H

- BoNTs

- *Clostridium botulinum*

UOMO BoNT A-B-E-F-H

UOMO BoNT H ibrido F/A

BoNT A-B-C-D-G-H

UCCELLI BoNT C-ibrido C/D

- *Clostridium baratii*

BOVINI BoNT D-ibrido D/C

- *Clostridium butyricum*

BoNT E



Basi del meccanismo d'azione delle BoNTs



Sinapsi Elettriche

Sinapsi Chimiche

Giunzione neuromuscolare



sinapsi chimica della giunzione neuromuscolare

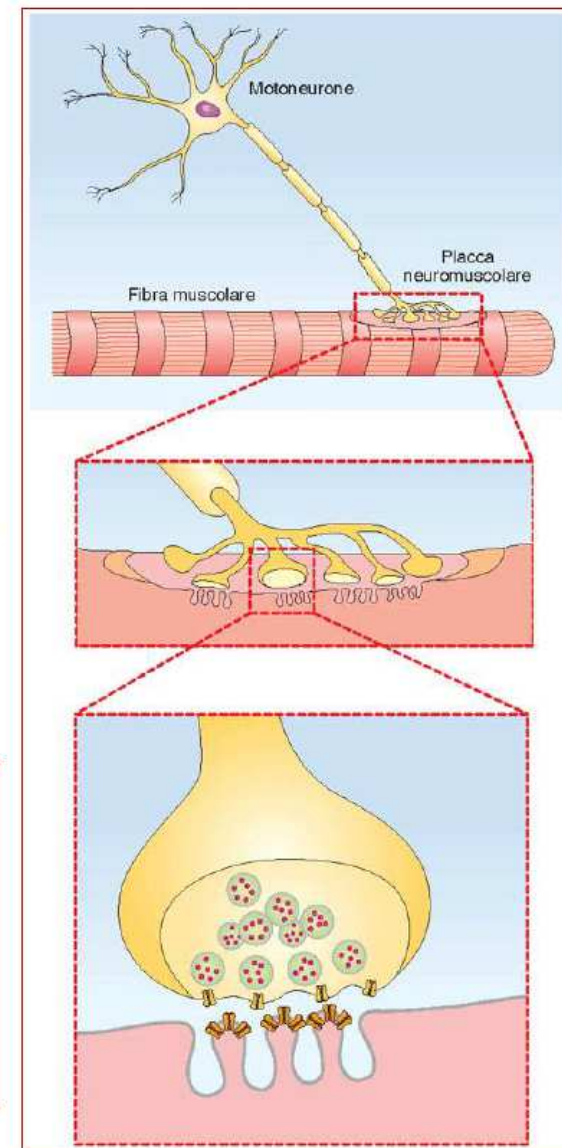
diretta, eccitatoria, colinergica

presinapsi: motoneurone

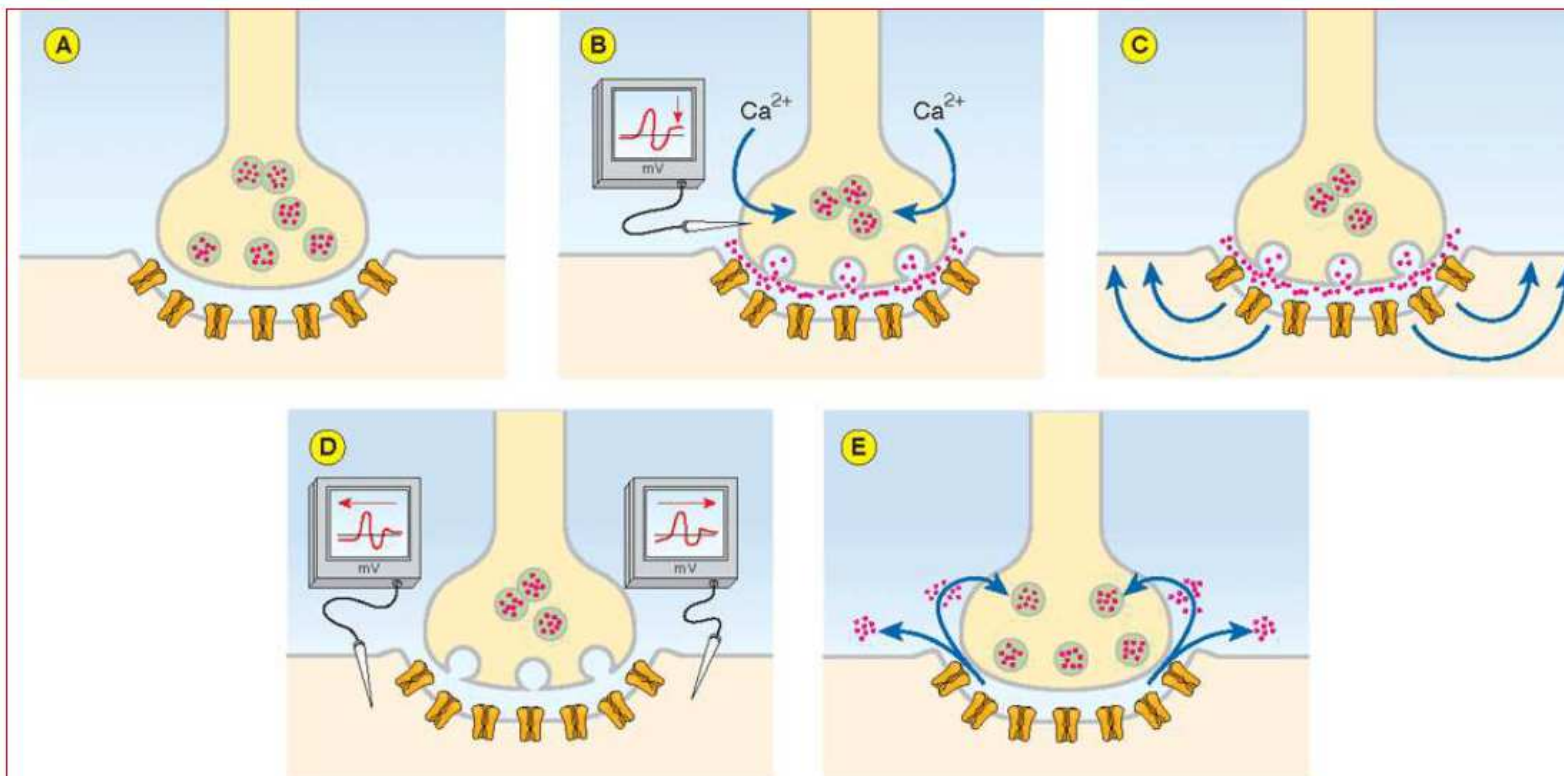
postsinapsi: cellula muscolare scheletrica

placca motrice, bottoni sinaptici, pieghe giunzionali, lamina basale

La giunzione neuromuscolare. I disegni rappresentano l'organizzazione strutturale della giunzione neuromuscolare a tre diversi ingrandimenti. Nella figura è stato omissso il sottile strato di cellule di Schwann che ricopre ciascun bottone sinaptico. Ogni bottone sinaptico contiene tutto quanto necessario alla liberazione del neurotrasmettitore acetilcolina. Sulle creste delle pieghe giunzionali, è presente un'elevata quantità di recettori per il neurotrasmettitore acetilcolina (ACh). Nel bottone sinaptico sono evidenti i canali del Ca^{2+} e le vescicole contenenti il neurotrasmettitore.



sinapsi chimiche



Le fasi della trasmissione chimica. **A)** Nella sinapsi chimica, a riposo, il neurotrasmettitore si trova racchiuso nelle vescicole sinaptiche. **B)** La trasmissione sinaptica chimica inizia con la liberazione del neurotrasmettitore indotta dal potenziale d'azione presinaptico. Questo processo è calcio dipendente e richiede l'apertura dei canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti presenti nella membrana della terminazione presinaptica. **C)** Il neurotrasmettitore diffonde attraverso la fessura sinaptica e si lega a specifiche molecole recettoriali presenti nella membrana della cellula postsinaptica. Il legame del neurotrasmettitore ai rispettivi recettori causa una variazione del potenziale circoscritto alla regione della membrana sinaptica in cui i recettori sono presenti. Successivamente, si generano correnti elettrotoniche tra la membrana sinaptica e le regioni di membrana elettricamente eccitabili limitrofe, dove sono presenti i canali del Na^+ e del K^+ voltaggio-dipendenti. **D)** Se l'intensità delle correnti elettrotoniche rende il potenziale della membrana eccitabile pari o superiore al valore soglia, nella cellula postsinaptica insorge il potenziale d'azione. **E)** La trasmissione termina con l'eliminazione del neurotrasmettitore dalla fessura sinaptica.

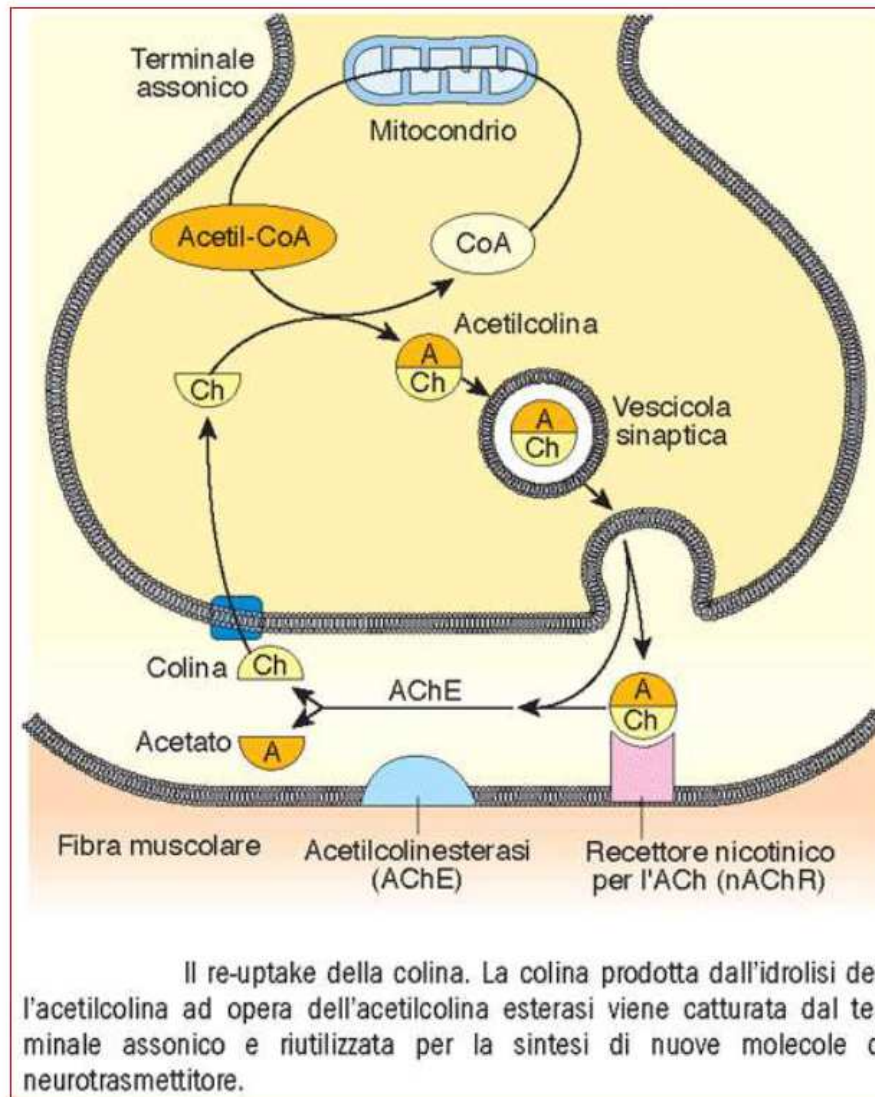
Prof. Davide Cervia - Fisiologia – Fisiologia della cellula: trasmissione sinaptica



interruzione della trasmissione neuromuscolare

alta efficienza di idrolisi dell'enzima
acetilcolina esterasi:
dopo 0,1 ms dal rilascio di ACh la
concentrazione di ACh nella fessura si
riduce a livelli in cui non si ha
attivazione dei canali

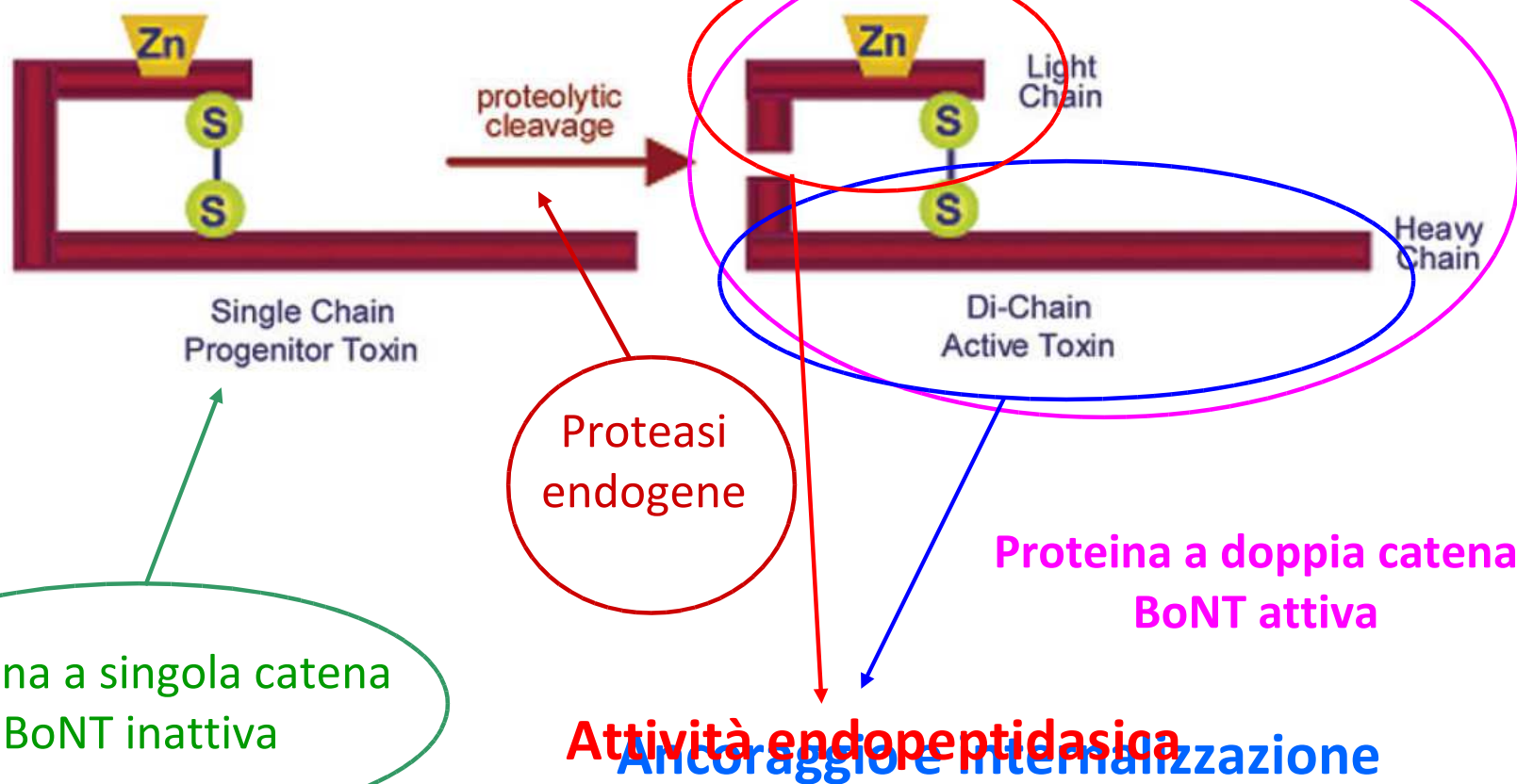
desensitizzazione recettoriale



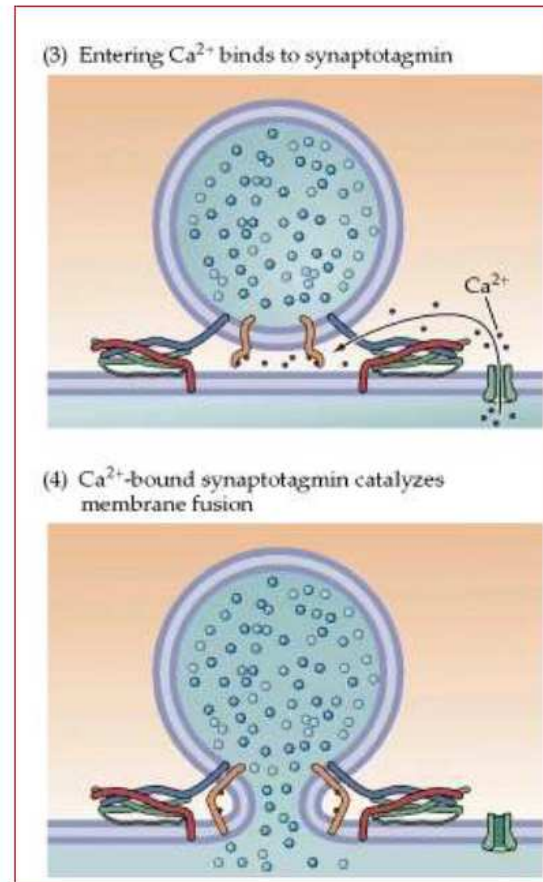
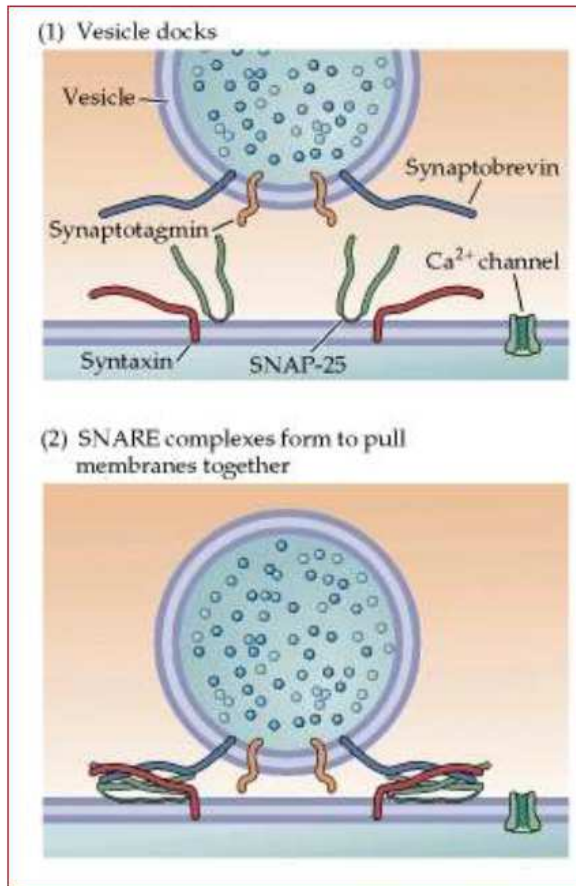
Prof. Davide Cervia - Fisiologia – Fisiologia della cellula: trasmissione sinaptica



Attivazione delle Bonts



Meccanismo di rilascio dell'acetilcolina



•Complesso SNARE

Membrana vescicolare:

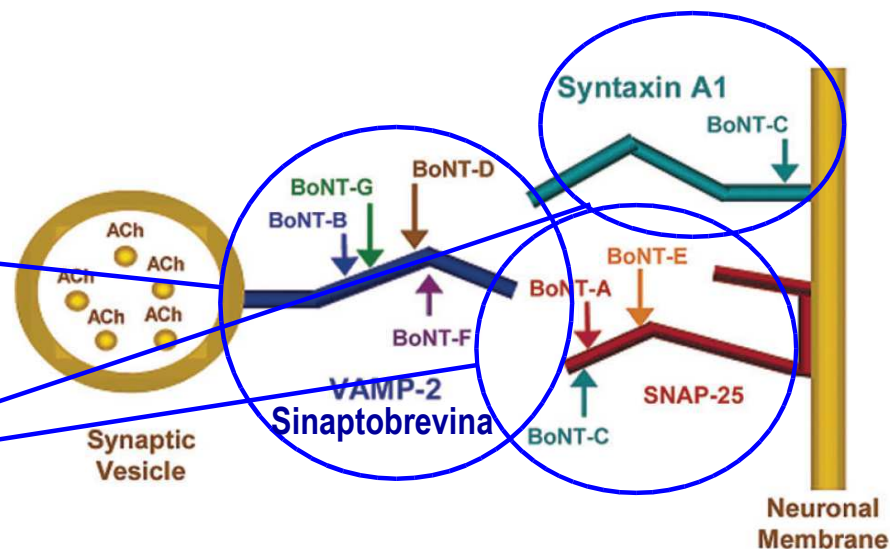
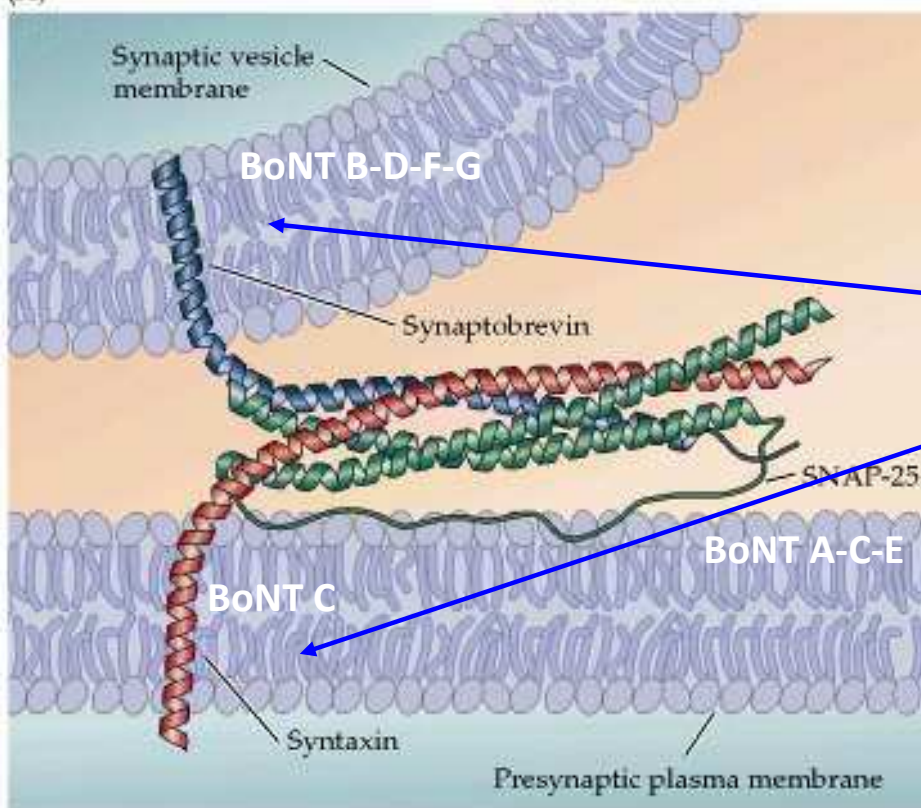
- 1) Sinaptobrevina o VAMP
- 2) Sinaptotagmina (sensore del Ca²⁺)

Membrana citoplasmatica:

- 1) Sintaxina
- 2) SNAP-25



Azione delle BoNTs attive



Complexo SNARE



Metodi alternativi al mouse-test

- Immunologici: ELISA, RIA, ELISA +immunoaffinity
- Sequenziamento peptidico: ESI-Mass Spectrometry MS (Q-TOF e MALDI-TOF)
- Liquid cromatografy +ion trap MS su digerito triptico
- Metodi molecolari (PCR)
- Endopeptidasi activity + immunoaffinity+ELISA
- Endopep-MALDI-TOF MS



ELISA

- Lindstrom M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:298-314.
- Sharma SK, Whiting RC. Methods for detection of Clostridium botulinum toxin in foods. *J Food Prot* 2005;68:1256-1263.
- Grate JW, et al. Advances in assays and analytical approaches for botulinum-toxin detection. *Trends Anal Chem* 2010;29:1137-1156.
- Scarlatos A, et al. Methods for detecting botulinum toxin with applicability to screening foods against biological terrorist attacks. *J Food Sci* 2005;70:r121-r130.
- Cai S, et al. Botulism diagnostics: from clinical symptoms to in vitro assays. *Crit Rev Microbiol* 2007;33:109-125.

VANTAGGI:

- Veloce
- No animali
- Molti campioni, formato 96-pozzetti

SVANTAGGI:

- Non è un test funzionale
- Falsi positivi per presenza di tossina inattivata
- Componenti del campione possono inattivare gli anticorpi
- Variazioni genetiche all'interno del sierogruppo possono causare falsi negativi



Metodi PCR

- Lindstrom M, Korkeala H. Laboratory diagnostics of botulism. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:298-314.
- Scarlato A, et al. Methods for detecting botulinum toxin with applicability to screening foods against biological terrorist attacks. *J Food Sci* 2005;70:r121-r130.
- Cai S, et al. Botulism diagnostics: from clinical symptoms to in vitro assays. *Crit Rev Microbiol* 2007;33:109-125.

Basati sull'identificazione di geni non forniscono
Indicazioni sulla presenza della tossina nel campione
Rispondono al criterio delle 3R, perché consentono di
evitare l'utilizzo del Mouse bioassay per la
tipizzazione delle BoNTs da ceppi isolati



Sequenza di peptidi

- van Baar BLM, et al. Characterisation of botulinum toxins type A and B, by matrix assisted laser desorption ionisation and electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2002;970:95-115.
- van Baar BLM, et al. Characterisation of botulinum toxins type C, D, E, and F by matrix-assisted laser desorption ionisation and electrospray mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2004;1035:97-114.
- Klaubert B, et al. Determination of botulinum toxins after peptic sample pre-treatment by multidimensional nanoscale liquid chromatography and nano-electrospray ion-trap mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2009;877: 1084-1092.
- Electrospray (ESI) tandem mass spectrometry (MS/MS) Q-TOF
- MALDI-TOF-MS
- Digestione triptica della coltura di arricchimento 2D chromatografy +ion-trap MS

Copertura non sufficiente ad individuare le forme mosaico C/D e D/C

La copurificazione di proteine associate al complesso BoNT rende difficile l'interpretazione



Attività proteasica

- Humeau Y, et al. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. Biochimie 2000;82:427-446.
 - Hallis B, et al. Development of novel assays for botulinum type A and B neurotoxins based on their endopeptidase activities. J Clin Microbiol 1996; 34:1934-1938.
 - Wictome M, et al. Development of an in vitro bioassay for Clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. Appl Environ Microbiol 1999;65:3787-3792.
 - Bagramyan K, et al. Attomolar detection of botulinum toxin type A in complex biological matrices. PLoS One 2008;3:e2041.
- Purificazione della tossina con anticorpi specifici
 - Uso di peptidi sintetici che mimano le proteine del complesso SNARE:
 - VAMP-2
 - SNAP-25
 - Rilevazione dei prodotti della digestione mediante vari tipi di ELISA

Questi metodi si sono rivelati complessi e poco sensibili



Endopep-MS

- Boyer AE, et al. From the mouse to the mass spectrometer: detection and differentiation of the endoproteinase activities of botulinum neurotoxins A-G by mass spectrometry. *Anal Chem* 2005;77:3916-3924.
- Kalb SR, et al. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal Biochem* 2006;351:84-92.
- Wang D, et al. Improved detection of botulinum neurotoxin type A in stool by mass spectrometry. *Anal Biochem* 2011;412:67-73.
- Wang D, et al. Improved detection of botulinum neurotoxin serotype A by Endopep-MS through peptide substrate modification. *Anal Biochem* 2013;432(2):115-123.
- Hedeland M, et al. Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS. *J Med Microbiol* 2011;60:1299-1305.
- Mazuet C, et al. Toxin detection in patient's sera by mass spectrometry during two outbreaks of type A Botulism in France. *J Clin Microbiol* 2012;50(12):4091-4094.

Vantaggi:

- Rileva la tossina attiva come il mouse test
- E' più veloce del mouse test (24h circa)
- MS per rilevare i prodotti di clivaggio terminali –N e –C
- Buona sensibilità con immunoconcentrazione

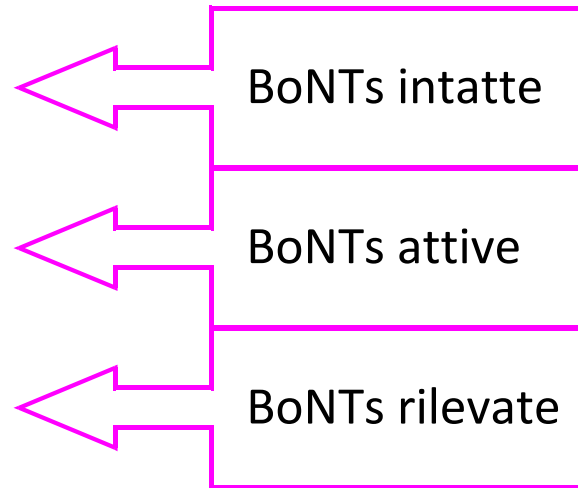


Endopep-MS

Cattura, con anticorpi, della catena pesante delle BoNTs

Clivaggio di peptidi sintetici (VAMP-2, SNAP-25)

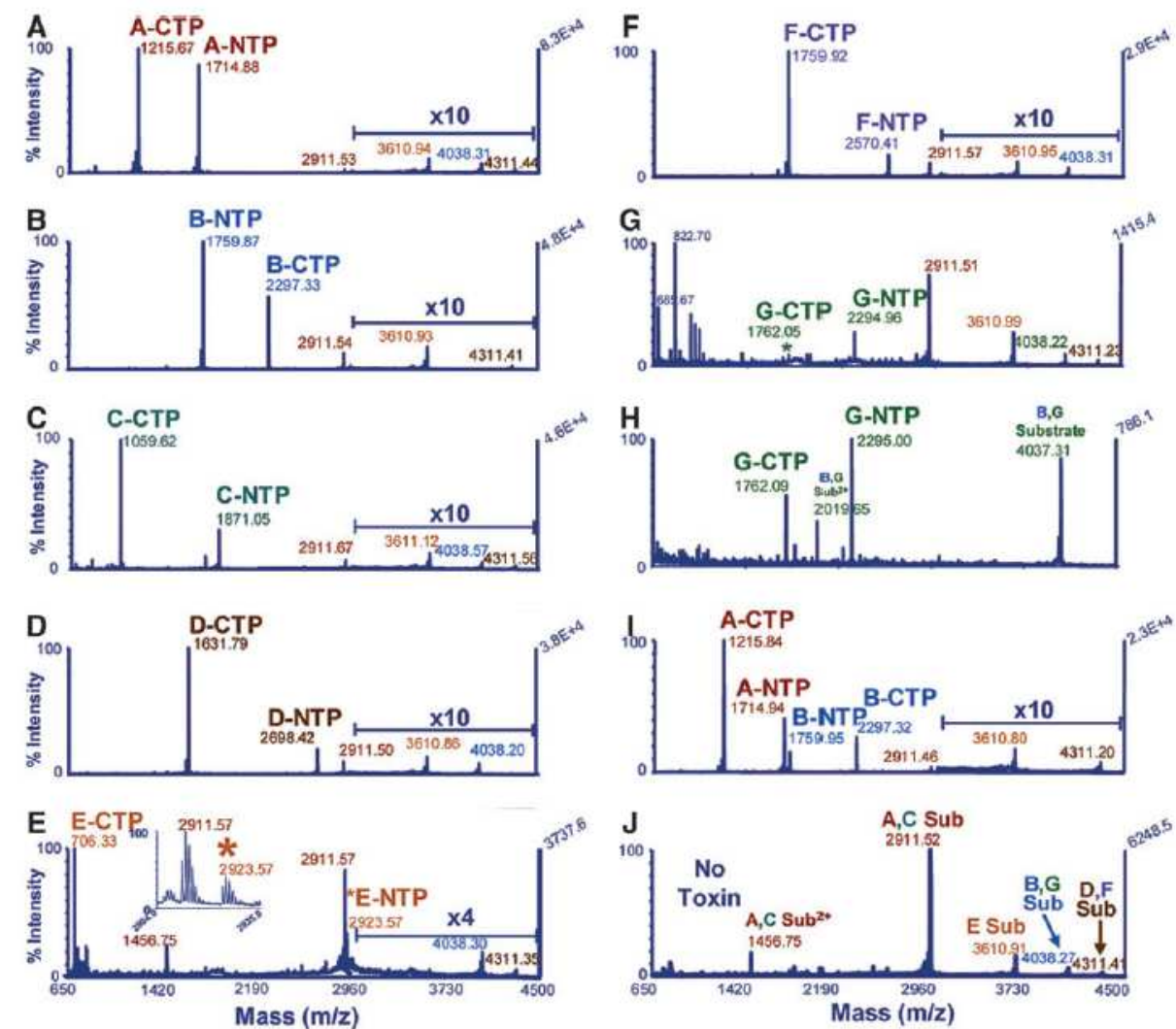
Identificazione con MALDI-TOF-MS



Svantaggi:

- **Non applicabile in tutti i laboratori**
- **Strumentazione molto costosa**
- **Sensibilità ancora non buona su alcune matrici (feci)**
- **Metodo ancora non validato**





Boyer AE, et al. From the mouse to the mass spectrometer: detection and differentiation of the endoprotease activities of botulinum neurotoxins A-G by mass spectrometry. *Anal Chem* 2005;77:3916-3924.

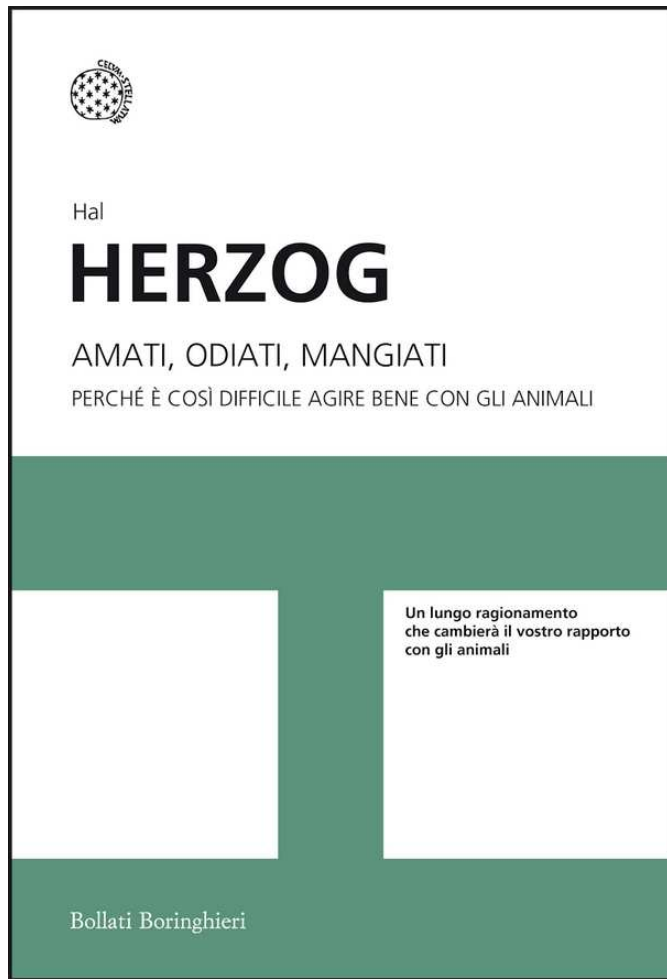
Figure 3. Multiplexed Detection of BoNT/A-G by MALDI-TOF-MS. Substrates (Sub), C-terminal (CTP), and N-terminal (NTP) cleavage products indicated in the mass spectra. Reprinted with permission from Boyer AE, Moura H, Woolfitt AR, et al. From the mouse to the mass spectrometer: detection and differentiation of the endoprotease activities of botulinum neurotoxins A-G by mass spectrometry. *Anal Chem* 2005;77:3916-3924. Copyright 2005 American Chemical Society. Color images available online at www.liebertpub.com/bsp



Approfondimenti



Approfondimenti



Rapporto uomo animali



conclusioni

Conclusione 1

Attualmente il **mouse bioassay** è ancora il **metodo d'elezione** per verificare la presenza di tossine botuliniche attive negli alimenti o campioni clinici

Conclusione 2

Non esiste un unico metodo alternativo candidato, ma una **combinazione di metodi**

Conclusione 3

L'utilizzo del mouse bioassay per le tossine botuliniche sarà presto **sostituito** da tali metodi alternativi, appena saranno disponibili le validazioni





GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

