

VALIDAZIONE DEI METODI ALTERNATIVI: SOSTITUZIONE DEL MOUSE TEST PER LA RILEVAZIONE DELLE TOSSINE BOTULINICHE IN ALIMENTI DESTINATI AL CONSUMO UMANO

Fabrizio Anniballi

Istituto Superiore di Sanità

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria
UO Sicurezza Microbiologica degli Alimenti e Malattie a Trasmissione Alimentare – One Health
Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo

Viale Regina Elena, 299 – 00161 Roma
Tel. 06 - 4990 2254 – Fax 06 – 4990 2045
fabrizio.anniballi@iss.it - cnr.botulismo@iss.it

OUTLINE

- ✓ Le Tossine Botuliniche (BoNTs)
- ✓ Ambiti analitici e requisiti metodologici
- ✓ Metodo «*Gold Standard*»
- ✓ Approcci analitici alternativi
 - Test immunoenzimatici
 - Test che determinano l'attività catalitica delle BoNTs
 - Test basati su colture cellulari
- ✓ Validazione dei metodi alternativi
- ✓ Metodo ISO

LE TOSSINE BOTULINICHE

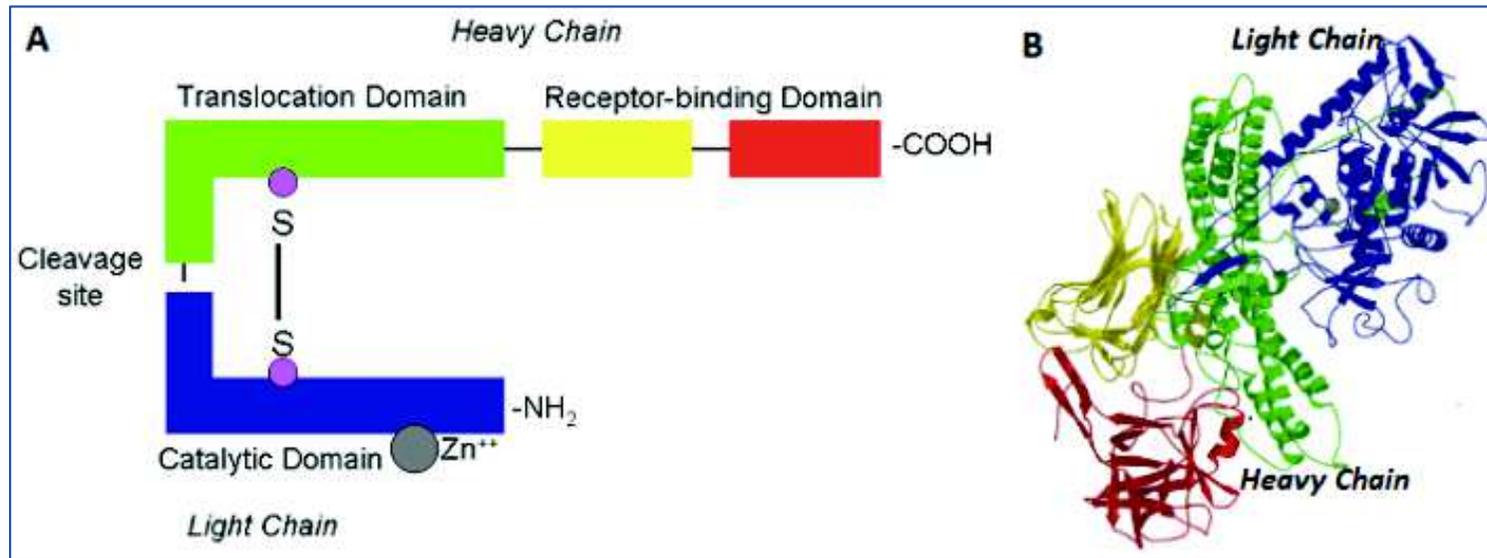


**BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO E METODI ALTERNATIVI ALLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE**

Roma, 14-18 OTTOBRE 2019 – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



LE TOSSINE BOTULINICHE



- ✓ Veleno naturale più potente per l'uomo (DL 0.1-1.0 ng/kg)
- ✓ Armi biologiche (Tier 1 agents – CDC)
- ✓ 7 Varianti antigeniche classificate (A-G) + altre varianti in corso di classificazione (H-X)
- ✓ Più di 40 sub-tipi

SPECIFICITA' DELLE BoNTs



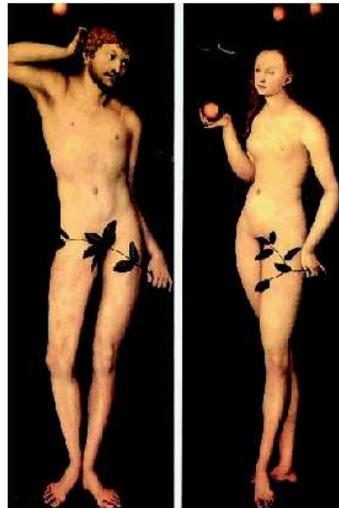
Tox tipo C, A



Tox tipo C, E



Tox tipo
D, C, B, A



Tox tipo
A, B, E, F, H, X

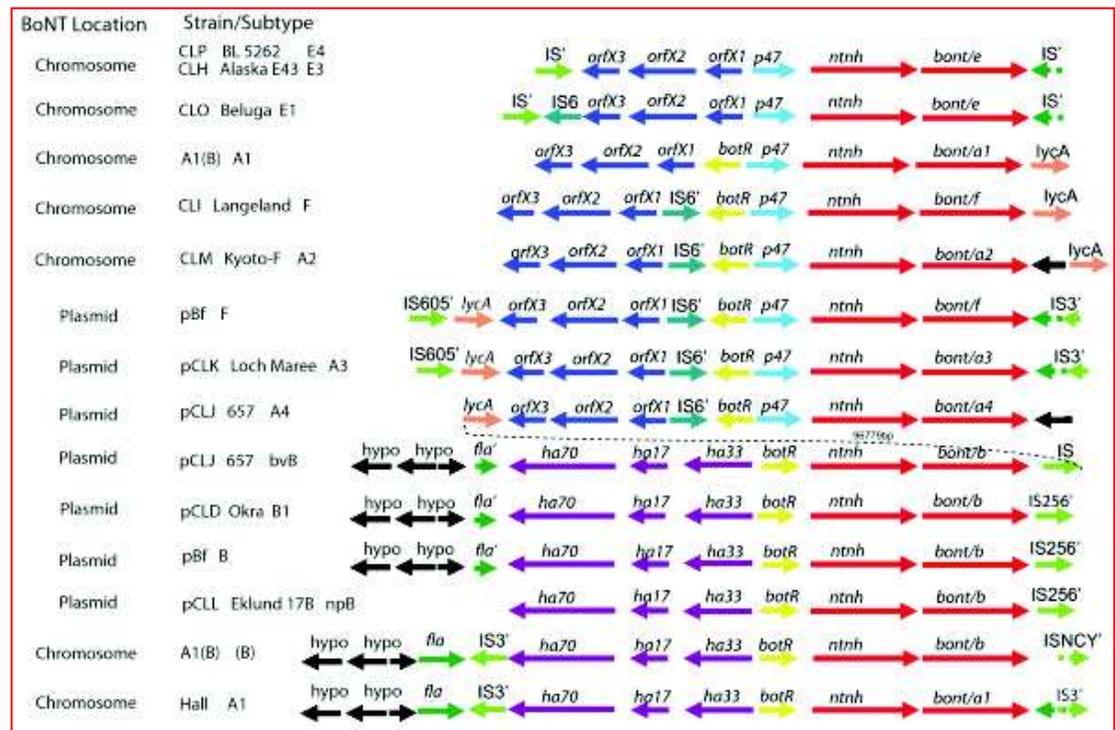


Tox tipo C



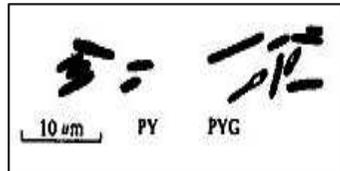
COMPLESSO DELLE BoNTs

- ✓ Gene *bont*
- ✓ Geni non tossici
 - *ntnh*
 - *Ha*

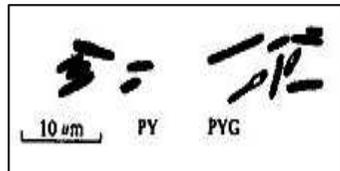


- ✓ Complesso genico può essere acquisito da altri microrganismi per trasferimento orizzontale

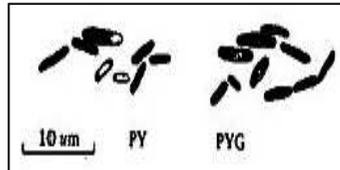
CLOSTRIDI PRODUTTORI DI BoNTs



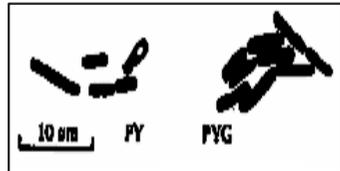
Clostridium botulinum
tox tipo A-B-C-D-E-F-G-X-H



Clostridium sporogenes
tox tipo B

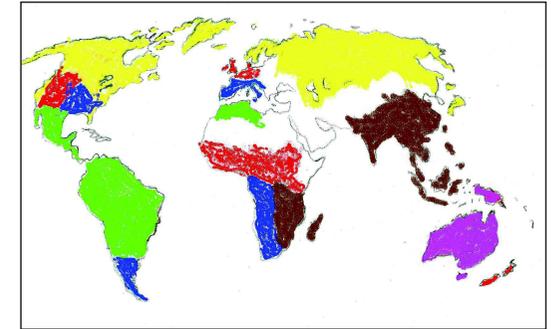


Clostridium butyricum
tox tipo E



Clostridium baratii
tox tipo F

Altre specie non appartenenti al genere
Clostridium veicolano geni codificanti per
proteine simili alle BoNTs



Tox tipo: A B E C-D A,B A,C-D

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2005, p. 511–513
0095-1137/05/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.43.1.511-513.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 43, No. 1

Infant Botulism Acquired from Household Dust Presenting as Sudden Infant Death Syndrome

Mari Nevas,^{1*} Miia Lindström,¹ Antti Virtanen,² Sebastian Hielm,¹ Markku Kuusi,³
Stephen S. Arnon,⁴ Erkki Vuori,² and Hannu Korkeala¹

Department of Food and Environmental Hygiene¹ and Department of Forensic Medicine,² University of Helsinki, Helsinki University, and National Public Health Institute, Helsinki,³ Finland, and California Department of Health Services, Richmond, California⁴

Received 15 July 2004/Returned for modification 25 July 2004/Accepted 5 September 2004

Epidemiol. Infect. (2015), 143, 461–469. © Cambridge University Press 2014
doi:10.1017/S0950268814002672

Infant botulism due to *C. butyricum* type E toxin: a novel environmental association with pet terrapins

E. B. SHELLEY^{1*}, D. O'ROURKE², K. GRANT³, E. McARDLE¹, L. CAPRA⁴,
A. CLARKE¹, E. McNAMARA⁵, R. CUNNEY^{6,7}, P. McKEOWN⁷,
C. F. L. AMAR³, C. COSGROVE⁸, M. FITZGERALD¹, P. HARRINGTON⁹,
P. GARVEY⁷, F. GRAINGER⁹, J. GRIFFIN¹⁰, B. J. LYNCH², G. McGRANE⁸,
J. MURPHY¹¹, N. NI SHUIBHNE² AND J. PROSSER⁸

AMBITI ANALITICI



**BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO E METODI ALTERNATIVI ALLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE**

Roma, 14-18 OTTOBRE 2019 – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



AMBITI ANALITICI

- ✓ Diagnosi di laboratorio del botulismo umano/animale
 - Campioni clinici (siero, feci, contenuto gastrico, essudato da ferita)
 - Residui alimentari/mangimi
 - ❖ Determinazione dell'attività biologica delle tossine
 - ❖ Risposte in tempi rapidi
- ✓ Controllo Ufficiale degli Alimenti
 - Conserve alimentari
 - REPFED
 - ❖ Determinazione dell'attività biologica delle tossine
- ✓ Controllo delle tossine botuliniche utilizzate come farmaco/cosmetico
 - Ogni lotto
 - ❖ Attività biologica e quantificazione del principio attivo

METODO «*GOLD STANDARD*»



**BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO E METODI ALTERNATIVI ALLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE**

Roma, 14-18 OTTOBRE 2019 – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



MOUSE BIOASSAY

-Performances-

- ✓ Rappresenta il Gold standard
- ✓ Basato su inoculo IP del campione
- ✓ Sensibilità ≈ 1 pg/ml (1 MLD)
- ✓ Specificità ottenuta mediante test di neutralizzazione con antitossine monospecifiche



MOUSE BIOASSAY

-Strengths-

- ✓ È l'unico sistema per la valutazione di tutti gli step del meccanismo di azione delle BoNTs (dall'assorbimento intestinale all'interno del neurone)
- ✓ Funziona anche con tossine/varianti non note o derivanti da riarrangiamenti di quelle note (es. BoNT/H)



MOUSE BIOASSAY

-Weakness-

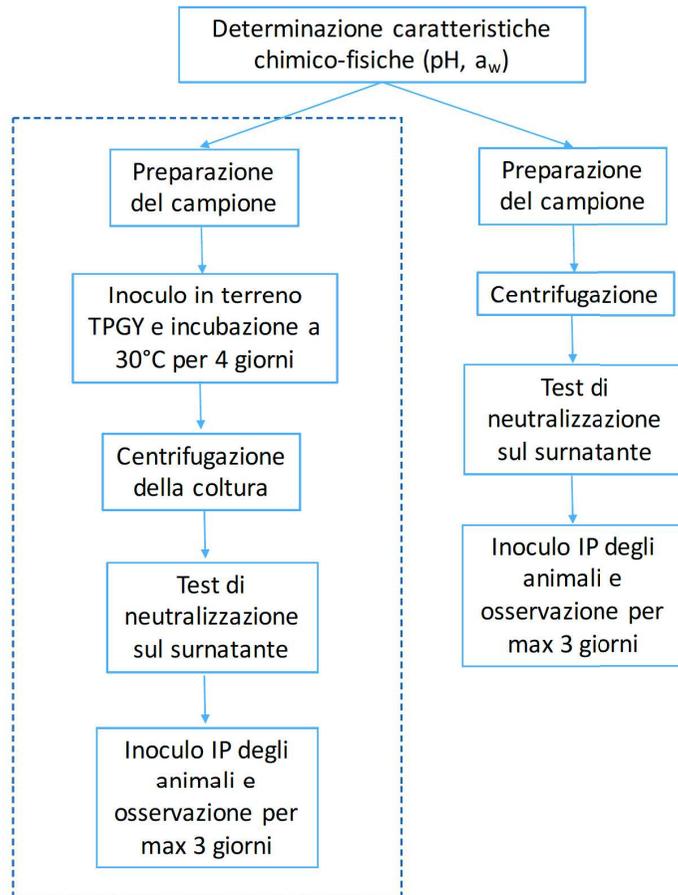
- ✓ Un singolo test richiede un minimo di 4 animale (16 per la tipizzazione)
- ✓ Richiede fino a 3 giorni per fornire il risultato
- ✓ Ha come end-point la morte degli animali non trattati
- ✓ Non è possibile sedare gli animali per alleviare le loro sofferenze che sono gravi nella fase finale
- ✓ Problemi di natura etica



MOUSE BIOASSAY - CNRB

Figura n.2

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



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



	DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA	
	CNRB30.011	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)

Edizione/Rev.	In vigore il: RAQ-SP	Redazione PTP-5-BM	Verifica RSA-3-BM RAF-BM	Approvazione DR-PM
00/0	G. Ciccagliani 14.01.2015	B. Auricchio	F. Anniballi / A. Fiore	L. Cozzi
00/1	G. Ciccagliani 10.08.2016	B. Auricchio	F. Anniballi / A. Fiore	D. De Medici
01/0	G. Ciccagliani 03.11.2017	B. Auricchio	F. Anniballi / A. Fiore	UDA-BM D. De Medici
01/1	12.07.2019 S. F. F.	B	F. Anniballi / A. Fiore	G

Descrizione delle modifiche:	<p>In tutto il documento: correzione dei refusi.</p> <p>Cap. 1: Integrazione del capitolo con l'inserimento delle prescrizioni di cui al D.lvo 14 marzo 2014 n. 26 in materia di utilizzo di animali a fini scientifici.</p> <p>Cap. 3: Aggiornati termini e definizioni con l'inserimento delle nuove specie di Clostridi produttori di tossine botuliniche e con le nuove varianti antigeniche di tossine botuliniche.</p> <p>Cap. 11: Inserirle indicazioni sulla necessità di procedere alle analisi anche in caso in cui le temperature di trasporto dei campioni non siano quelle ottimali.</p> <p>Cap.13 Nota 3 e Nota 4: Dettagliate le modalità di esecuzione del mouse test in caso in cui non sussista urgenza analitica per ridurre il numero di animali utilizzati, in ottemperanza al D.lvo 14 marzo 2014 n. 26 in materia di utilizzo di animali a fini scientifici.</p> <p>Cap. 13. Paragrafo 13.3.1.1: eliminata la prescrizione relativa alla necessità di protrarre l'incubazione di ulteriori 8 giorni in caso di asserza di torbidità nei tubi incubati per 96 h ± 2h.</p>
------------------------------	---

Copia controllata n° _____

Copia non controllata

APPROCCI ANALITICI ALTERNATIVI



**BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO E METODI ALTERNATIVI ALLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE**

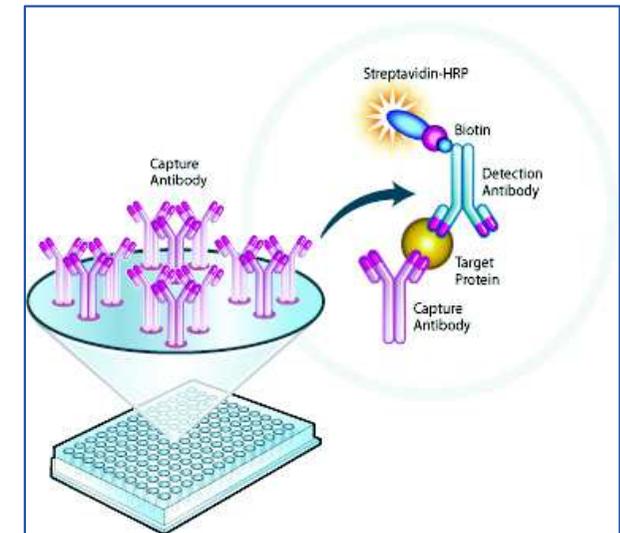
Roma, 14-18 OTTOBRE 2019 – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



TEST IMMUNOENZIMATICI

-Performances-

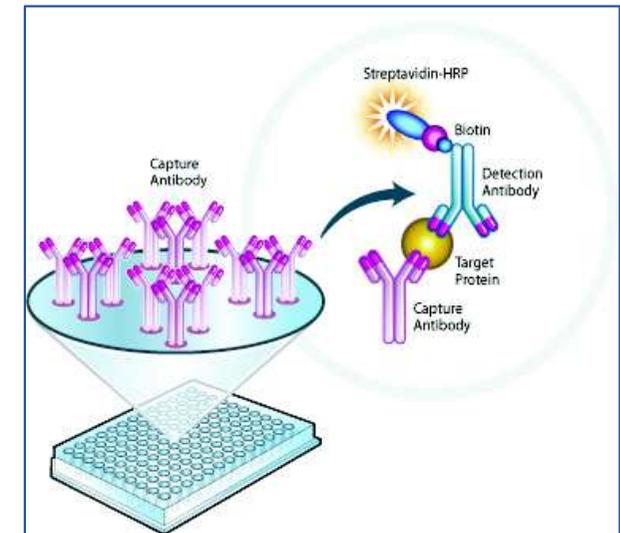
- ✓ E' il primo tra i metodi alternativi ad essere stato sviluppato (si usa da oltre 30 anni)
- ✓ Sono state proposte diverse varianti
- ✓ Sensibilità 1-10 MLD
- ✓ Nelle sue applicazioni viene generalmente utilizzato come metodo di screening seguito dalla conferma dei positivi con mouse test



TEST IMMUNOENZIMATICI

-Strengths-

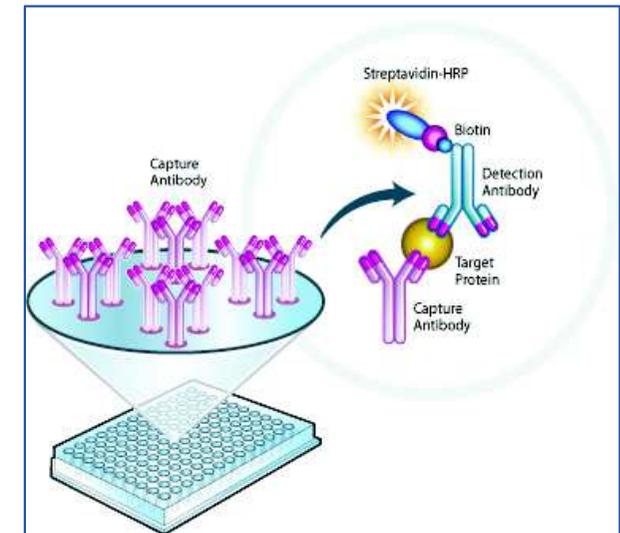
- ✓ Il test può essere completato in 6 h
- ✓ Si può eseguire in qualsiasi laboratorio
- ✓ Può essere automatizzato (Luminex)
- ✓ Alcuni protocolli sono stati validati come metodi di screening sia su alimenti che su campioni biologici
- ✓ Alcune varianti possono essere miniaturizzate (biosensori)



TEST IMMUNOENZIMATICI

-Weakness-

- ✓ Non permette di discriminare BoNTs attive da quelle inattive
- ✓ Utilizza gli anticorpi
- ✓ Sono descritte cross reattività soprattutto nell'analisi di matrici complesse come gli alimenti



ENDOPEPTIDASI

-Performances-

- ✓ E' basato sulla determinazione dei frammenti dei peptidi sintetici che contengono il sito di taglio della tossina
- ✓ Sensibilità nel range 0.1-10 MLD
- ✓ È specifico per tutte le BoNTs note



ENDOPEPTIDASI

-Strengths-

- ✓ Il test è molto specifico
- ✓ Determina l'attività catalitica della tossina
- ✓ Come metodo di rilevamento del taglio enzimatico può essere utilizzata sia la spettrometria di massa che metodi fluorimetrici
- ✓ Richiede minime quantità di campione



ENDOPEPTIDASI

-Weakness-

- ✓ Richiede una fase di preparazione del campione laboriosa per eliminare eventuali proteasi non specifiche
- ✓ Utilizza gli anticorpi per la purificazione del campione
- ✓ Sono richieste apparecchiature sofisticate e personale addestrato
- ✓ Determina solo l'attività catalitica
- ✓ E' molto costoso



COLTURE CELLULARI

-Performances-

- ✓ Rappresenta la più promettente alternativa al mouse test
- ✓ Possono essere utilizzate diverse linee cellulari, anche ingegnerizzate (neuro-2a, PC12, SK-N-SH, neuroni primari di pollo o di topo, midollo spinale di ratto)



COLTURE CELLULARI

-Strengths-

- ✓ Capace di mimare molti ma non tutti gli step dell'intossicazione *in vivo*



COLTURE CELLULARI

-Weakness-

- ✓ I metodi finora sviluppati hanno bassa sensibilità
- ✓ Richiede tempi lunghi di analisi e di mantenimento delle linee cellulari
- ✓ Richiede personale addestrato
- ✓ Solo 2 metodi sono stati validati ma coperti da brevetto
- ✓ Le matrici complesse possono contaminare le cellule fornendo risultati falsamente positivi



VALIDAZIONE DEI METODI ALTERNATIVI



**BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO E METODI ALTERNATIVI ALLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE**

Roma, 14-18 OTTOBRE 2019 – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



RIFERIMENTI NORMATIVI

- ✓ Reg (CE) 882/2004
 - Considerando 17. *...i laboratori che partecipano all'analisi di campioni ufficiali dovrebbero ... usare metodi di analisi che siano stati convalidati nei limiti del possibile.*
 - Art.10. p.4. *...le seguenti misure di attuazione possono essere adottate dalla Commissione: b) ... procedure di convalida dei metodi ...*

RIFERIMENTI NORMATIVI

- ✓ Reg (UE) 2017/625
 - *Art 52. ... per assicurare un approccio flessibile e proporzionato, in particolare per i laboratori che accertano la sanità di animali e piante, si dovrebbe prevedere l'adozione di deroghe al fine di consentire che alcuni laboratori non siano accreditati per tutti i metodi che essi utilizzano. Ciò avviene in particolare quando non sono disponibili metodi convalidati per individuare organismi nocivi per le piante.*
 - *Art 98. ...è opportuno attribuire alla Commissione competenze di esecuzione al fine di garantire condizioni uniformi di attuazione del presente regolamento, compresi, tra l'altro ... i metodi di campionamento, prova e diagnosi di laboratorio nonché la loro convalida e interpretazione...*



RIFERIMENTI NORMATIVI

- ✓ Reg (UE) 2017/625
 - *Art 34. ... i laboratori ufficiali applicano uno dei seguenti metodi a seconda della relativa idoneità per le esigenze specifiche di analisi, prova e diagnosi:*
 - a) *Metodi disponibili conformi a pertinenti norme o protocolli riconosciuti internazionalmente...; o metodi pertinenti sviluppati o raccomandati dai laboratori di riferimento e convalidati in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente*
 - b) *In assenza delle norme o dei protocolli di cui alla lettera a), metodi conformi alle norme o se tali norme non esistono, metodi pertinenti sviluppati e raccomandati dai laboratori di riferimento e convalidati in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente; o metodi pertinenti sviluppati e convalidati da studi interlaboratorio o intralaboratorio sulla convalida dei metodi in base a protocolli scientifici accettati internazionalmente*

ISO 17025:2018

✓ 7.2.2 Validazione dei metodi

- ✓ Il laboratorio deve validare i metodi non normalizzati, i metodi sviluppati dal laboratorio e i metodi normalizzati utilizzati al di fuori del relativo campo di applicazione previsto, o modificati in qualsiasi altro modo. La validazione deve estendersi per quanto necessario a soddisfare le esigenze di una data applicazione o campo di applicazione.
- ✓ Le tecniche utilizzate per la validazione del metodo possono essere una, o una combinazione, delle seguenti:
 - a) *Taratura e/o valutazione dello scostamento sistematico (bias) e della precisione utilizzando campioni o materiali di riferimento;*
 - b) *Valutazione sistematica dei fattori che influenzano i risultati;*
 - c) *Verifica della robustezza del metodo di prova, mediante la variazione dei parametri tenuti sotto controllo, quali per esempio la temperatura dell'incubatore..*
 - d) *Confronto con i risultati ottenuti con altri metodi validati;*
 - e) *Confronto interlaboratorio*
 - f) *Valutazione dell'incertezza di misura dei risultati...*

ISO 16140

NORMA EUROPEA	Microbiologia di alimenti e mangimi per animali Protocollo per la validazione di metodi alternativi	UNI EN ISO 16140
		NOVEMBRE 2011
	Microbiology of food and animal feeding stuffs Protocol for the validation of alternative methods	
	La norma specifica il principio generale e il protocollo tecnico per la validazione di metodi alternativi nel campo delle analisi microbiologiche di alimenti, mangimi per animali e campioni ambientali e veterinari.	
	TESTO INGLESE	
	La presente norma è la versione ufficiale in lingua inglese della norma europea EN ISO 16140 (edizione maggio 2003) e dell'aggiornamento A1 (edizione agosto 2011).	
	La presente norma sostituisce la UNI EN ISO 16140:2005.	
	ICS 07.100.30	
UNI Ente Nazionale Italiano di Unificazione Via Sarmio, 2 20137 Milano, Italia	© UNI Riproduzione vietata. Tutti i diritti sono riservati. Nessuna parte del presente documento può essere riprodotta o diffusa con un mezzo qualsiasi, fotocopia, microfilm o altro, senza il consenso scritto dell'UNI. www.uni.com	
	UNI EN ISO 16140:2011	Pagina 1



BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO E METODI ALTERNATIVI ALLA SPERIMENTAZIONE ANIMALE

Roma, 14-18 OTTOBRE 2019 – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



METODO ISO

Determinazione delle tossine botuliniche negli alimenti



**BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO E METODI ALTERNATIVI ALLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE**

Roma, 14-18 OTTOBRE 2019 – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana



ISO/PWI 20796

ISO/TS 34/SC 9/WG 26 Detection of *Clostridium botulinum* toxins in food

ISO/PWI 20796
Microbiology of the food chain
Method of the detection of *Clostridium botulinum* toxins (A, B, E, F) in food, based on immunological method
Part 1: Horizontal method for sample preparation

DRAFT

1. Scope

This Technical Specification specifies a horizontal method for extraction and concentration of botulinum neurotoxins (BoNTs).

A separate document describes the screening and confirmation methods for detection and identification of BoNTs in foods intended for human consumption.

Other botulinum neurotoxins such as serotypes C, D, H, X could also cause illness. This document is applicable only to serotypes A, B, E, F, but may apply to other serotypes of BoNTs, subject to validation of the method.

4. Principle

4.1 General

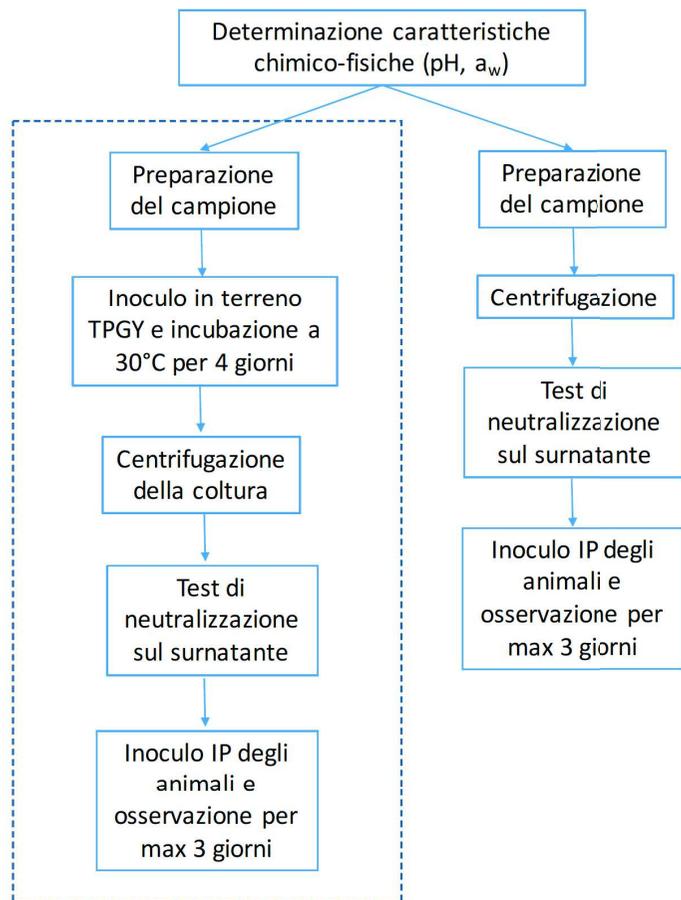
The method comprises the following consecutive steps:

- a. Preparation of test portion;
- b. Storage of the test sample;
- c. Extraction of BoNTs;
- d. Concentration of the extract;
- e. Recovery of the concentrated extract;
- f. Storage and steps before detection.

METODI ANALITICI 1



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



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

DIPARTIMENTO SICUREZZA ALIMENTARE, NUTRIZIONE E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA AREA BIOLOGIA MOLECOLARE E MICROBIOLOGIA				
CNRB39.010	METODO PER LA RICERCA DI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E PER LA RICERCA DI TOSSINE BOTULINICHE (METODO CULTURALE E MOUSE TEST)			REV. 0
Edizione/Rev.	In vigore il:	Redazione:	Verifica:	Approvazione:
00/0	G. Ciccapioni 14.01.2015	B. Auricchio	F. Annibali / A. Fiore	L. Cozzi
00/1	G. Ciccapioni 10.08.2016	B. Auricchio	F. Annibali / A. Fiore	D. De Medici
01/0	03.11.17	[Signature]	[Signature]	[Signature]
Descrizione delle modifiche:	Intestazione: adeguamento alla nuova denominazione del dipartimento; In tutto il documento: aggiornamento dei riferimenti alla denominazione del dipartimento e del reparto come definiti in seguito al riordino dell'ISS; adeguamento alle nuove prescrizioni della procedura generale "Gestione documentazione"; Correzione dei refusi.			
<input type="checkbox"/> Copia controllata n° _____		<input type="checkbox"/> Copia non controllata		
Pag. 1 di 20 E' vietata la riproduzione anche parziale del presente documento				





Grazie per l'attenzione !



**BENESSERE DEGLI ANIMALI DA LABORATORIO E METODI ALTERNATIVI ALLA
SPERIMENTAZIONE ANIMALE**

Roma, 14-18 OTTOBRE 2019 – Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana

