



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di laurea magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione

**Validazione della procedura EndoPep-MS come tecnica diagnostica per il
rilevamento delle tossine botuliniche attive**

Relatore:

Prof.Ssa Barbara Cardazzo

Correlatore:

Dott.Ssa Ilenia Drigo

Laureanda:

Martina Marcolin

Matricola n° 2029456

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Sommario

Riassunto:.....	2
Abstract:.....	3
1. INTRODUZIONE	4
1.1. BOTULISMO - PATOLOGIA e PATOGENESI	6
1.1.1. Botulismo alimentare.....	7
1.2. CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINA BOTULINICA	10
1.3. LE NEUROTOSSINE BOTULINICHE.....	14
1.3.1. Struttura delle tossine botuliniche.....	14
1.3.2. Meccanismo di azione delle BoNT	16
1.4. SORVEGLIANZA E CONTROLLI IN FILIERA	20
1.5. NORMATIVA PER IL BENESSERE ANIMALE	22
1.6. METODI PER LA RILEVAZIONE DELLE TOSSINE:.....	24
1.6.1. <i>Gold standard</i>	25
1.7. METODI INNOVATIVI: MALDI-TOF TECNICA ENDOPEP-MS	27
2. SCOPO:	29
3. MATERIALI E METODI.....	31
3.1. MATERIALI	31
3.2. METODI	36
3.2.1 Biotinizzazione degli anticorpi specifici e legame alle biglie magnetiche	36
3.2.2 Cattura e concentrazione della tossina con le biglie coattate con gli anticorpi	37
3.2.3 Rilevazione delle tossine mediante Endopep-MS.....	38
3.2.4 Analisi con MALDI-TOF MS.....	38
3.2.5 Valutazione della sensibilità analitica del metodo in soluzione.....	39
3.2.6 Valutazione della sensibilità analitica del metodo con anticorpi.....	40
3.2.7 Valutazione della specificità dell'anticorpo legato a biglie e le rispettive tossine.....	41
3.2.8 Valutazione del limite di rilevabilità su campioni contaminati artificialmente	42
3.2.9 Applicazione del metodo Endopep su campioni incogniti	42
4. RISULTATI	45
4.1 VALIDAZIONE PRELIMINARE DEL METODO.....	45
4.2 VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ANALITICA DEL METODO IN SOLUZIONE	50
4.3 VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DELL'ANTICORPO LEGATO ALLE BIGLIE E LE RISPETTIVE TOSSINE	52
4.4 VALUTAZIONE DEL LIMITE DI RILEVABILITÀ SU CAMPIONI CONTAMINATI ARTIFICIALMENTE	53
4.5 APPLICAZIONE DEL METODO ENDOPEP SU CAMPIONI INCOGNITI	58

5. CONSIDERAZIONI FINALI.....	61
Bibliografia:.....	63
Sitografia:.....	65
Ringraziamenti:.....	67

Riassunto:

Le neurotossine botuliniche (BoNT) sono delle proteasi di origine batterica e rientrano tra le sostanze più tossiche attualmente conosciute.

A causa della loro pericolosità è di vitale importanza disporre di strumenti diagnostici affidabili e di facile utilizzo al fine di garantire la sicurezza alimentare e la salute pubblica. L'attuale metodo *gold standard* è una prova biologica su topi (MBA), ma grazie alle nuove normative europee nell'ambito della protezione degli animali usati a scopo sperimentale, si è avviata la ricerca di tecniche alternative altrettanto efficienti. In questo contesto si colloca il progetto, il cui scopo è validare il metodo EndoPep-MS su MALDI *Biotyper sirius* (Bruker) per l'analisi diagnostica qualitativa delle BoNT, in particolare sui sierotipi A, B, C, D, E ed F.

Il metodo è stato validato analizzando campioni contaminati sperimentalmente, dimostrando che il metodo EndoPep-MS adattato allo strumento MALDI *Biotyper sirius* può registrare risultati comparabili con il *test* in vivo in termini di limite di rilevabilità. Le caratteristiche diagnostiche del metodo (sensibilità, specificità, accuratezza, valore predittivo positivo e negativo) hanno inoltre evidenziato buoni risultati migliorabili analizzando una maggior quantità di campioni infettati.

Abstract:

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are proteases of bacterial origin and are among the most toxic substances currently known.

Because of their dangerousness, it's important to have reliable and easy-to-use diagnostic tools for food safety and public health. The current gold standard method is a bioassay on mice (MBA), but thanks to the new European regulations for the protection of animals used for experimental purposes, research for equally efficient alternative techniques has begun. The project fits into this context, the aim of which is to validate the EndoPep-MS method on MALDI Biotyper sirius (Bruker) for the qualitative diagnostic analysis of BoNTs, on serotypes A, B, C, D, E, and F.

The method was validated by analysing experimentally contaminated samples. These results indicate that the EndoPep-MS method adapted to the MALDI Biotyper sirius instrument can record results comparable with the in vivo test in terms of detection limit. The diagnostic characteristics of the method (sensitivity, specificity, accuracy, positive and negative predictive value) have also shown good results which can be improved by analysing a greater quantity of infected samples.

1. INTRODUZIONE

Le neurotossine botuliniche, altrimenti denominate con la sigla BoNT, sono delle sostanze di origine batterica con attività neurotossica nell'uomo e negli animali, la cui manifestazione patologica è il botulismo. Dato il loro elevato effetto, talvolta letale, queste neurotossine vengono classificate come potenziali armi bioterroristiche (Simpson, 1992; Peck *et al.*, 2011).

[1]

I microorganismi responsabili della produzione di queste sostanze rientrano nel genere *Clostridium*, si tratta di batteri ubiquitari che comunemente si possono trovare nell'ambiente sotto forma di *spore*. Le specie attualmente riconosciute come produttrici di BoNT sono *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii*, *Clostridium butyricum* e *Clostridium argentinense*, anche se recentemente geni BoNT-like sono stati individuati in specie non appartenenti al genere *Clostridium* come *Weissella oryzae*, *Enterococcus spp.* e *Chryseobacterium piperi* (Simpson, 1992; Mansfield *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018; Wentz *et al.*, 2017; Kalia *et al.*, 2011; Sakaguchi *et al.*, 2020; Fach *et al.*, 2009). [1; 2; 3]

A causa della loro diffusione i Clostridi produttori di tossina botulinica sono un rischio per la contaminazione di specifici alimenti che risultano idonei alla loro proliferazione. Durante la crescita batterica i microorganismi producono infatti le neurotossine che possono intossicare l'uomo e gli animali a sangue caldo e alcune specie ittiche, in seguito all'ingestione del cibo contaminato. [2; 4]

Le tossine botuliniche vengono suddivise in otto sierotipi denominati con le lettere, dalla A all' H, sulla base della diversa attività antigenica e ciascuna di esse agisce su un sito bersaglio diverso. [1]

¹ Anibaldi F., *Botulismo alimentare*. [Online] Available at: <https://www.epicentro.iss.it/botulismo/> [Consultato il giorno 16/11/2022]

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, *Botulismo*. [Online] Available at: <https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/botulismo/> [Consultato il giorno 16/11/2022].

³ Istituto Superiore di Sanità, 2019. *Botulismo*. [Online] Available at: [https://www.iss.it/focus/-/asset_publisher/92GBB5m5b1hB/content/botulismo#:~:text=I%20numeri%20e%20la%20patologia,per%20il%20Botulismo%20\(CNRB\)](https://www.iss.it/focus/-/asset_publisher/92GBB5m5b1hB/content/botulismo#:~:text=I%20numeri%20e%20la%20patologia,per%20il%20Botulismo%20(CNRB)) [Consultato il giorno 16/11/2022].

⁴ Istituto Superiore di Sanità, 2022. Alimentazione, nutrizione e sicurezza degli alimenti. [Online] Available at: https://www.iss.it/alimentazione-nutrizione-sicurezza-alimenti/-/asset_publisher/I5M6X036FZD6/content/metodi-di-analisi [Consultato il giorno 22/11/2022].

Date le potenzialità patologiche di queste molecole, risulta quindi di fondamentale importanza poterne determinare rapidamente la presenza nei campioni sospetti.

L'attuale *gold standard* per la rilevazione della presenza di BoNT in un campione è rappresentata dalla prova biologica su topo. Tale prova consiste nella valutazione della letalità a seguito della somministrazione intraperitoneale *in vivo* della tossina estratta da un campione o da una brodocoltura batterica. L'analisi risulta molto sensibile e utile per l'identificazione, oltre che della presenza di BoNT, anche del sierotipo della tossina, ma ha numerosi svantaggi, tra i quali il sacrificio di numerosi animali ed inoltre richiede almeno quattro giorni per la conferma di negatività dei campioni testati (Barr *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2005).^[2]

L'attuale normativa europea, a fronte della crescente sensibilità in tema di sperimentazione animale, chiede che venga utilizzato il minor utilizzo possibile di animali da laboratorio, fissa le condizioni minime di benessere e stimola la continua ricerca di tecniche strumentali alternative ai *test* diagnostici *in vivo* (Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2010).

Tra le tecniche alternative in fase di sperimentazione per la ricerca delle tossine botuliniche spicca il metodo EndoPep-MS basato su tecnologia MALDI-TOF inizialmente sviluppato presso il Center for Disease Control and Prevention di Atlanta e di seguito applicato con successo anche da altri laboratori per la rilevazione e la differenziazione di tutti i sierotipi di BoNT. Tale metodica è risultata infatti in grado di rilevare le tossine in modo accurato e con una sensibilità paragonabile se non anche migliore del *gold test* in alcuni casi (Barr *et al.*, 2005; Drigo *et al.*, 2020; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2016).

1.1.BOTULISMO - PATOLOGIA e PATOGENESI

Il botulismo è una malattia potenzialmente fatale causata dall'attività neuro-paralitica di neurotossine prodotte da alcuni microorganismi appartenenti al genere *Clostridium*.

La manifestazione clinica della patologia consiste nella paralisi simmetrica dei nervi cranici accompagnata da una debolezza simmetrica discendente e conseguente paralisi flaccida senza deficit sensoriali. Tale paralisi è determinata dal blocco del rilascio dell'acetilcolina causato dall'attività delle tossine a livello delle terminazioni nervose colinergiche periferiche. L'acetilcolina funge infatti da segnale per le giunzioni neuromuscolari e l'inibizione del suo rilascio blocca le contrazioni muscolari volontarie e involontarie, favorendo al contrario il rilassamento muscolare (Simpson, 1992). ^[1; 2]

Esistono diverse forme di botulismo: ^[1]

- **Alimentare:** è la forma più comune, causata da ingestione di alimenti contaminati dalla tossina;
- **Da ferita:** determinata dalla produzione di neurotossine botuliniche nelle ferite contaminate dai clostridi produttori in seguito della loro proliferazione e della conseguente produzione di tossine;
- **Intestinale:** coinvolge sia bambini sia adulti. È causata dalla presenza di batteri produttori di tossina nell'apparato gastroenterico, i quali moltiplicandosi avviano anche la produzione di neurotossine. In base all'età del soggetto si divide in:
 - Infantile – interessa i lattanti come meno di un anno di vita, in cui avviene una colonizzazione temporanea del lume intestinale e una conseguente produzione delle tossine botuliniche;
 - Dell'adulto – anche in questo caso avviene per colonizzazione intestinale ma colpisce la popolazione di età superiore ad un anno e generalmente persone fragili affette da grave disbiosi intestinale, ossia con un microbiota intestinale notevolmente alterato a causa di patologie o terapie.
- **Iatrogeno:** è una forma molto rara che si manifesta in seguito ad un'errata procedura di somministrazione della tossina per uso cosmetico o terapeutico.
- **Da inalazione:** si tratta di una forma estremamente rara ed è causata dal rilascio deliberato o accidentale nell'ambiente delle tossine botuliniche sotto forma di aerosol.

Il Paese col più alto numero di casi di botulismo in Europa è l'Italia. Secondo gli ultimi report del Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB) i laboratori specializzati italiani dal 1986 al 2019 hanno confermato 501 casi di botulismo, riconducibili a 342 incidenti diversi. La maggior parte dei casi risulta essere correlata al consumo di prodotti vegetali (Simpson, 1992; Peck *et al.*, 2011).^[1; 2; 3]

1.1.1. Botulismo alimentare

Il botulismo alimentare rappresenta sicuramente la forma più comune di botulismo ed è determinato dall'assunzione di tossina preformata attraverso il consumo di alimenti contaminati. La contaminazione solitamente è accidentale ed è dovuta essenzialmente al fatto che i Clostridi produttori di BoNT si possono comunemente trovare nell'ambiente sotto forma di spore. In particolare, si è osservata la loro presenza in: polvere, suolo, sedimenti, acqua, vegetali e animali. Le spore sono forme di resistenza che il microrganismo adotta in condizioni avverse e che gli permettono di rimanere quiescente per lunghi periodi (anche decenni), assumendo nuovamente la forma di cellula vegetativa qualora le condizioni ambientali si presentino favorevoli. I fattori coinvolti nella germinazione e nello sviluppo dei clostridi produttori di tossina botulinica sono diversi (Peck *et al.*, 2011):^[1; 5]

- Condizioni anaerobiche: l'assenza di ossigeno è un prerequisito indispensabile per l'avvio della germinazione dei Clostridi
- Presenza di L-alanina e altri aminoacidi (come L-lattato) nel cibo: L-alanina è un amminoacido (α AA) essenziale per l'innescamento della germinazione delle spore, essa viene captata dai recettori germinativi espressi sulla superficie esterna della spora e prodotti dal batterio in fase di sporulazione. Altri aminoacidi possono essere germinativi come L-lattato ma hanno un'efficacia minore.
- Lisozima: solo tra lo 0,1 e l'1% delle spore dei botulini non proteolitici risultano permeabili al lisozima. Il lisozima nei cibi idrolizza il peptidoglicano delle spore e idrata il nucleo inducendo la germinazione.
- pH neutro o basico è l'ideale per la germinazione dei *Clostridium botulinum*.

⁵ Istituto Superiore di Sanità, s.d. Focus - Botulismo - Botulismo alimentare. [Online] Available at: [https://www.iss.it/focus/-/asset_publisher/92GBB5m5b1hB/content/botulismo#:~:text=I%20numeri%20e%20la%20patologia,per%20il%20Botulismo%20\(CNRB\)](https://www.iss.it/focus/-/asset_publisher/92GBB5m5b1hB/content/botulismo#:~:text=I%20numeri%20e%20la%20patologia,per%20il%20Botulismo%20(CNRB)) [Consultato il giorno 16/11/2022].

Lo studio e il controllo della cinetica di germinazione delle spore dei CPTB sono essenziali per garantire la sicurezza alimentare nei processi biotecnologici della produzione (Peck *et al.*, 2011).

Osservando i fattori favorevoli alla proliferazione dei Clostridi è evidente che non tutti gli alimenti sono a rischio per lo sviluppo di tossina botulinica, in particolare i prodotti freschi non presentano condizioni anaerobiche tali da favorire la vitalità e la moltiplicazione del patogeno. Invece, risultano a rischio i prodotti alimentari non correttamente conservati che presentano un pH maggiore di 4,6 e non prevedono trattamenti di acidificazione, fermentazione o cottura con tempi e temperature sufficienti all'eliminazione delle spore botuliniche.

In Italia gli alimenti di produzione domestica sono maggiormente soggetti a rischi e i prodotti principalmente coinvolti in casi di botulismo sono: olive nere in acqua, verdure e funghi conservati in olio e in acqua, conserve di pesce ed in particolare di tonno, conserve di carne, zuppe e minestrone non adeguatamente refrigerati (Viviani, 2016). ^[1; 2]

Il botulismo alimentare può interessare soggetti di tutte le età, ma non è trasmissibile da persona a persona. Il decorso è molto soggettivo e può manifestarsi con sintomatologia lieve e autolimitante oppure con forme molto gravi, in alcuni casi con esito fatale. I sintomi registrati con maggiore frequenza dall'ISS sono riconducibili alla paralisi neurale e sono: ^[1; 5]

- annebbiamento e diplopia, cioè lo sdoppiamento della vista
- midriasi bilaterale: dilatazione delle pupille
- ptosi: difficoltà a mantenere aperte le palpebre
- disartria: difficoltà nell'articolare le parole
- difficoltà nella deglutizione
- xerostomia: secchezza di bocca e fauci
- stipsi e di rado ritenzione urinaria

La manifestazione di tali sintomi in media avviene tra le 12 e le 36 ore dall'assunzione dell'alimento contaminato, anche se possono comparire anche dopo solo 6 ore e fino a 15 giorni. Quanto più è precoce la comparsa dei sintomi nel soggetto tanto più gravi risulteranno i sintomi che possono evolvere verso l'insufficienza respiratoria, il blocco dei segnali nervosi ai muscoli respiratori, ed in assenza di adeguato sostegno medico portare alla morte nel circa 5-10% dei casi. ^[1; 3; 5]

La cura consiste nella somministrazione per via endovenosa di antitossina polivalente o monovalente distribuita dal Ministero della Salute. Tale somministrazione deve avvenire il prima possibile all'esordio dei sintomi e in ambiente controllato in quanto l'effetto neutralizzante si esplica solo sulla tossina non legata. Pertanto, il paziente affetto da botulismo necessita di ospedalizzazione possibilmente in terapia intensiva (Anniballi *et al.*, 2013).

A seconda della gravità del caso può essere necessario o meno anche l'utilizzo di tecniche mediche per la sopravvivenza del paziente, come: supporto alla ventilazione, ventilazione assistita, nutrizione parenterale e, decontaminazione intestinale con l'uso del carbone attivo.

La diagnosi di botulismo si basa sia sull'osservazione clinica del soggetto, sia sulla conferma definitiva dall'analisi di laboratorio. È essenziale che l'esito ottenuto sia corretto e tempestivo, ma può essere difficile da ottenere e la criticità principale risiede proprio nella generalità della sintomatologia nella fase di esordio. Esiste infatti la possibilità che il medico curante confonda un caso di botulismo con altre patologie più frequenti a carico del sistema nervoso o dell'apparato gastrointestinale, in particolare, la diagnosi differenziale del botulismo infantile comprende sintomi generici che la rendono confondibile con: sepsi, disidratazione, squilibrio elettrolitico, miastenia gravis, atrofia muscolare spinale, sindrome di Guillain-Barré o di Miller-Fisher, encefalite, sindrome di Lambert-Eaton, intossicazioni alimentari o da sostanze chimiche (Anniballi *et al.*, 2013). ^[1;3]

1.2. CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINA BOTULINICA

Nel 1897 Emile van Ermengem descrisse per la prima volta la presenza di un microrganismo sporigeno e anerobio in grado di produrre una neurotossina potenzialmente fatale e lo chiamò, *Clostridium botulinum* dal termine latino *botulus*, cioè salsiccia, proprio perché nelle prime osservazioni della patologia venne associata al consumo di questi insaccati preparati in casa. Successivamente si scoprì che queste neurotossine potevano essere prodotte anche da altri microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* come *C. baratii* (BoNT/F), *C. butyricum* (BoNT/E) e *C. argentinense* (BoNT/G). Recentemente geni BoNT-like sono stati individuati anche in specie come *Weissella oryzae*, *Enterococcus spp.*, e *Chryseobacterium piperi* (Simpson, 1992; Mansfield *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018; Wentz *et al.*, 2017; Kalia *et al.*, 2011; Sakaguchi *et al.*, 2020; Fach *et al.*, 2009). [1; 2; 3]

I clostridi produttori di tossina botulinica (CPTB) sono bacilli anaerobi, gram positivi, ubiquitari e sporigeni. Le endospore sono forme di resistenza importanti per il loro phylum di appartenenza, i Firmicutes. Esse consentono la sopravvivenza del microrganismo anche in condizioni avverse mantenendo il batterio in uno stato di quiescenza per lunghi periodi, anche per anni, in attesa di un ambiente favorevole in cui germinare. In particolare, le spore botuliniche risultano resistenti alle alte temperature fino ai 121 °C con meno di 3 minuti di esposizione, ai trattamenti con alta pressione, all'esposizione alla luce UV e ai trattamenti di essiccazione (Galli *et al.*, 2016; Brunt *et al.*, 2016; Talukdar *et al.*, 2015).

Per questi motivi le spore dormienti non rappresentano un pericolo immediato per l'uomo, ma in condizioni idonee possono germinare producendo cellule attive che moltiplicandosi sintetizzano la neurotossina. Le condizioni ambientali favorevoli per la germinazione delle spore e la produzione delle tossine sono (Peck *et al.*, 2011; Brunt *et al.*, 2016; Talukdar *et al.*, 2015): [1; 3; 6]

- assenza di ossigeno;
- pH maggiore di 4,6;

⁶ Food and Drugs Administration, 2014. Water Activity (aw) in Foods. [Online] Available at: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/water-activity-aw-foods> [Consultato il giorno 23/11/2022].

- elevate quantità di acqua libera necessaria per le funzioni vitali. In particolare, un valore di activity water (aw) maggiore di 0,935, (rapporto tra la tensione di vapore dell'alimento all'equilibrio con l'aria e la tensione di vapore dell'acqua distillata);
- substrati contenenti elevate quantità di proteine perché i microrganismi non riescono a sintetizzare tutti gli amminoacidi per loro essenziali.

I CPTB sono in grado di produrre diversi tipi di BoNTs differenziabili a seconda della loro attività antigenica. Al momento sono conosciute 9 varianti denominate con le lettere dell'alfabeto da A ad H e X (Simpson, 1992; Drigo *et al.*, 2020). ^[1; 2; 3]

Ogni ceppo produce solitamente una sola tossina anche se esistono alcune eccezioni (Peck *et al.*, 2011): ^[1; 3]

- alcuni CPTB presentano geni codificanti per più tipi di tossine ma ne sintetizzano solamente una. Per esempio, il ceppo di tipo A(B) presenta entrambi i geni ma sintetizza esclusivamente la tossina A.
- altri ceppi hanno la capacità di produrre da due a tre sierotipi di tossina contemporaneamente e in quantità differenti. Per esempio, il ceppo di tipo Ab presenta sia i geni codificanti per BoNT/A sia per BoNT/B, ed esprime entrambe le tossine, ma A in quantità maggiore rispetto alla B.

Dal punto di vista genetico i CPTB risultano una specie polifiletica che mediante sequenziamento del 16S rDNA e *test* di ibridazione può essere divisa in 4 gruppi indicati con i numeri romani da I a IV. Il gruppo I include i ceppi proteolitici A, B ed F, il gruppo II è costituito da ceppi produttori di tossina E ed i ceppi non proteolitici produttori di tossina B ed F. Il gruppo III contiene ceppi in grado di produrre le tossine C, e D e i mosaici CD e DC ed infine il gruppo IV è costituito dai ceppi di *C. argentinense* produttori di tossina G. I ceppi batterici causa della maggior parte dei casi di botulismo alimentare appartengono ai gruppi I e II (Peck *et al.*, 2011).

Per i gruppi I, II e IV sono noti batteri strettamente correlati a livello genetico ma che non producono tossina botulinica come *C. sporogenes*, *C. Novyi*, e *C. subterminale* (Peck *et al.*, 2011; Hatheway, 1990; Weigand *et al.*, 2015).

Nella tabella che segue vengono messe in relazione le principali caratteristiche dei ceppi appartenenti ai quattro gruppi sopra menzionati (Peck *et al.*, 2011; Brunt *et al.*, 2016). ^[1; 3]

	Gruppo I	Gruppo II	Gruppo III	Gruppo IV o <i>C. argentinense</i>
Forma di botulismo	Alimentare	Alimentare	Animale	Animale e rari casi umani
Metabolismo	proteolitico	saccarolitico e psicrotrofico	Saccarolitico	proteolitico
Tipo di neurotossine	A, B o F	B, E o F	C, D o ibridi (tipo C/D o D/C)	G
N° tossine	1 o più	1	1	1
T ottimale	Mesofilo (37°C)	(25°C)	Mesofilo (37°C)	Mesofilo (37°C)
Clostridi equivalenti	<i>C. sporogenes</i>	/	<i>C. novyi</i> e <i>C. haemolyticum</i>	<i>C. subterminale</i>

Tabella 1. Caratteristiche differenti dei quattro gruppi di *Clostridium botulinum* (Peck *et al.*, 2011; Brunt *et al.*, 2016; Weigand *et al.*, 2015). ^[1; 3]

Svolgendo un'analisi filogenetica è infatti possibile osservare una specifica correlazione tra i Clostridi equivalenti e i *Clostridium botulinum* dei diversi gruppi, evidenziando una maggiore similarità tra questi che non tra il genere *Clostridium botulinum*, confermando una suddivisione polifiletica e una nomenclatura basata sulla capacità di produrre specifici sierotipi di tossina con differente attività antigenica (Peck *et al.*, 2011; Mansfield *et al.*, 2015; Weigand *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2005).

Nella Figura 1 viene proposto un albero filogenetico che compara le similarità genetiche tra i gruppi di *Clostridium botulinum* e i generi *C. baratii* (gruppo V produttore di BoNT/F) e *C. butyricum* (gruppo VI produttore di BoNT/E).

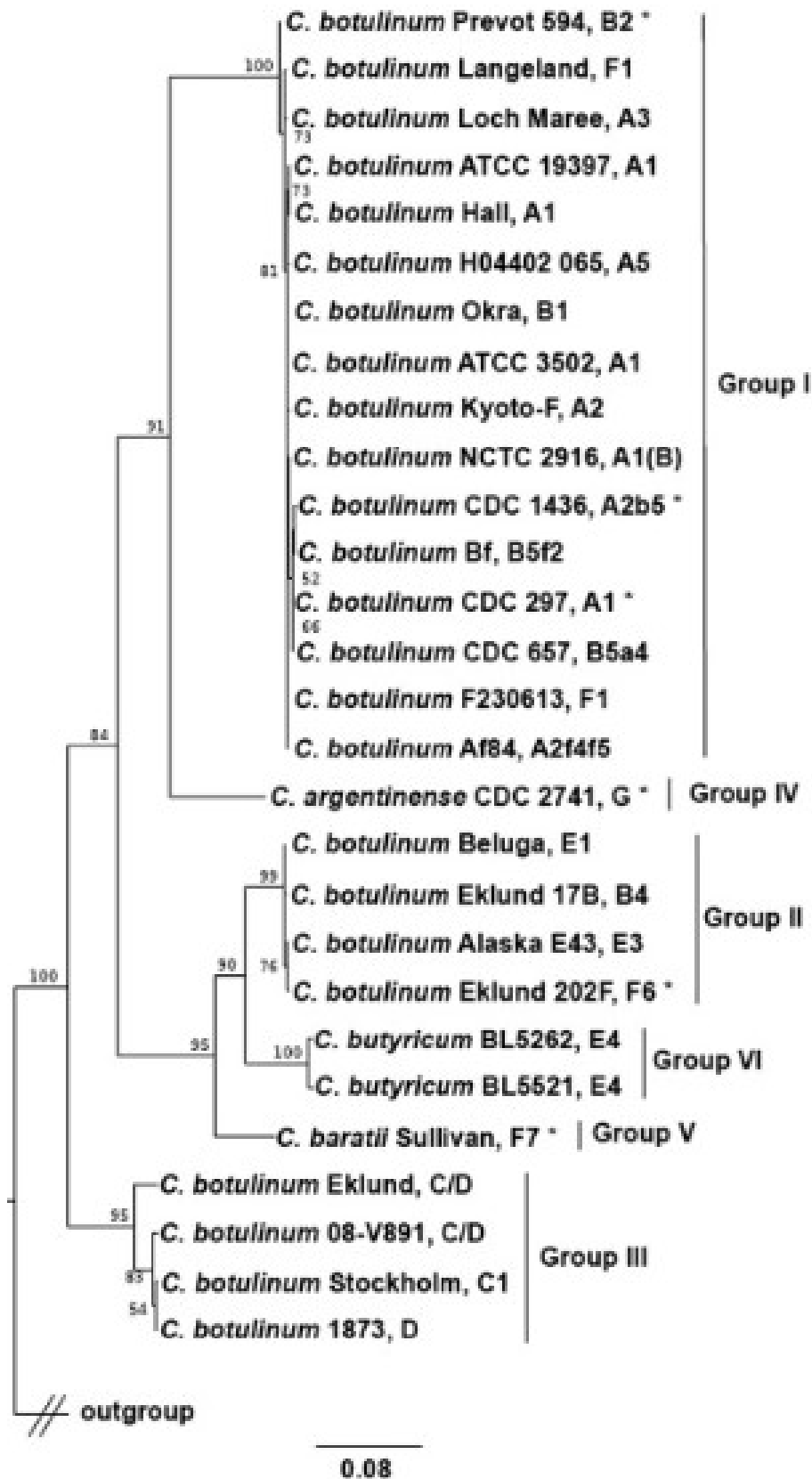


Figura 1. Albero filogenetico maximum-likelihood delle sequenze 16S rrr di ceppi di *Clostridium botulinum* e *Clostridi equivalenti* (Smith et al., 2015).

1.3. LE NEUROTOSSINE BOTULINICHE

Le BoNT sono considerate il più potente veleno naturale ad oggi conosciuto, tanto da essere classificate come potenziale arma bioterroristica. Un solo grammo di tossina botulinica di tipo A assunta per ingestione può uccidere più di quattordicimila persone. Piccolissime quantità, 30-100ng, assunte con il consumo di alimenti contaminati possono essere sufficienti a provocare malattia o morte di un uomo (Simpson, 1992; Peck *et al.*, 2011).^[3]

Attualmente si conoscono 9 sierotipi di tossina, probabilmente tutte derivanti da una proteina ancestrale e nominate con le lettere dell'alfabeto da A ad H e X che, a loro volta possono essere classificate in oltre 40 sub-tipi (Simpson, 1992; Drigo *et al.*, 2020).^[1; 2; 3]

Le varianti H e X sono state scoperte solo di recente ed in particolare la BoNT/H risulta essere un ibrido tra le già note BoNT/F e BoNT/A, mentre la BoNT/X presenta solo il 30% di similarità con le altre BoNT, non viene riconosciuta dagli antisieri contro le altre tossine note e presenta un sito di azione diverso rispetto a quest'ultime (Masuyer *et al.*, 2018; Martínez-Carranza *et al.*, 2023).^[3]

Le tossine A, B, E e, anche se raramente, F sono quelle maggiormente coinvolte in casi di botulismo umano e nello specifico di origine alimentare. I sierotipi "C" e "D" e i loro mosaici CD e DC invece colpiscono prevalentemente gli animali.^[1; 2; 3]

1.3.1. Struttura delle tossine botuliniche

Le BoNT sono delle metallo-proteasi globulari termolabili che presenteranno una struttura amminoacidica ben definita. In condizioni fisiologiche esse assumono, infatti, una struttura terziaria e quaternaria specifica (Figura 2), con la presenza di un sito attivo che catalizza reazioni di tipo proteolitico, saccarolitico o psicotrofico (Viviani, 2016; Brunt *et al.*, 2016).^[3]

Queste neurotossine vengono prodotte sotto forma di precursore inattivo (pro-tossina) a singola catena di 150 kDa e secrete assieme a varie proteine non tossiche che nel loro insieme formano un complesso proteico arrivando fino a 900 kDa, a seconda del sierotipo.

Tale precursore viene successivamente attivato mediante scissione in due diversi peptidi legati da un ponte disolfuro ad opera di proteasi sia endogene del batterio che esogene di origine esterna. Questo processo prende il nome di "nicking" e non è ancora stato del tutto

chiarito. Le tossine non proteolitiche sembrano sfruttare enzimi presenti nell'intestino dell'ospite, mentre si ipotizza che i *Clostridium botulinum* proteolitici producano essi stessi autonomamente l'enzima di attivazione. Secondo recenti studi, l'enzima endogeno per l'attivazione delle tossine proteolitiche potrebbe essere una cisteina ad attività endopeptidasica con un peso di 62kDa (Simpson, 1992; Peck *et al.*, 2011; Dressler *et al.*, 2022; Cai *et al.*, 2021; Sebahia *et al.*, 2007).

La proteolisi porta alla formazione di due catene proteiche unite da un ponte disolfuro:

- La catena pesante di 100 kDa (HC), che a sua volta presenta due porzioni:
 - Il dominio C-terminale responsabile del legame alle terminazioni nervose presinaptiche
 - Il Dominio N-terminale coinvolto nel trasferimento della catena LC nel citosol mediante endocitosi mediata da recettori
- La catena leggera di circa 50 kDa (LC), ad attività enzimatica contiene una molecola di zinco che agisce andando a tagliare specifiche proteine target.

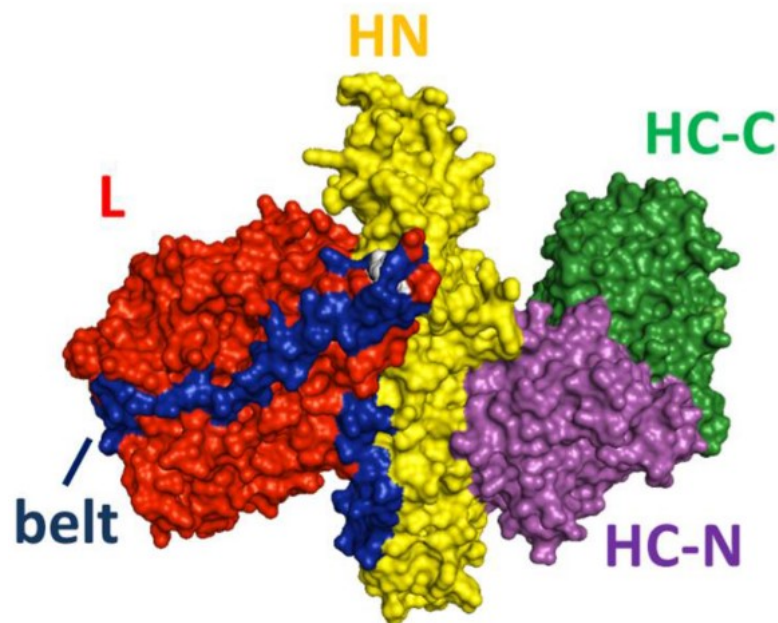


Figura 2. (a) Struttura cristallina tridimensionale della tossina A (Pirazzini, 2018).

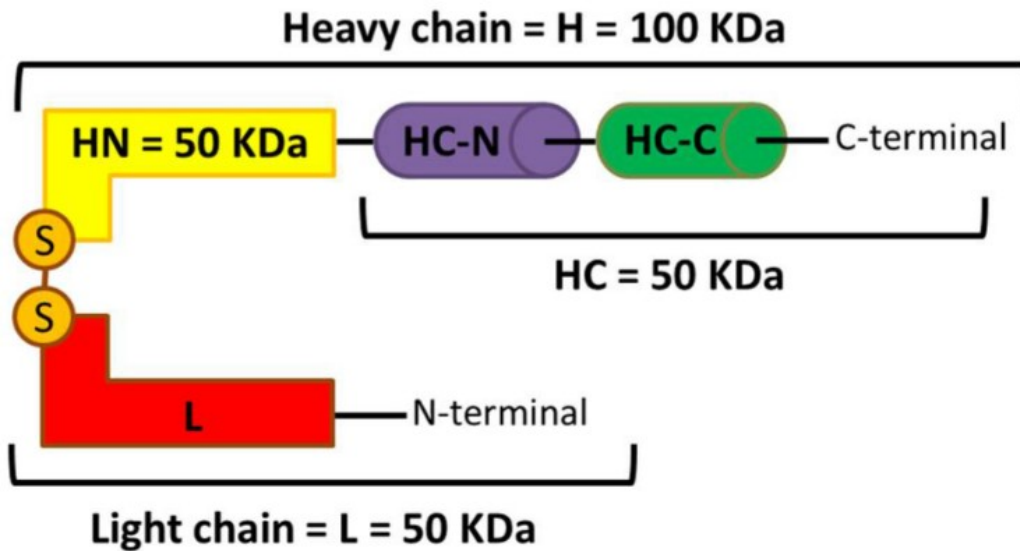


Figura 2. (b) Divisione grafica della struttura delle BoNT nei suoi sottodomini funzionali: HC-C (in verde) e HC-N (in viola) mediano il legame della BoNT alla membrana plasmatica neuronale; mentre HN (in giallo) media la traslocazione della L-metalloproteasi (in rosso) nel citosol e sono tenuti insieme con il legame disolfuro (S-S) (Pirazzini, 2018).

Le singole neurotossine botuliniche dal punto di vista della sequenza amminoacidica possono differire tra di loro fino al 70%, mentre tra i vari sottotipi la differenza si attesta tra il 2,6 e il 32% (Peck *et al.*, 2011; Weigand *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2005).

1.3.2. Meccanismo di azione delle BoNT

Come accennato in precedenza le BoNT agiscono andando a esplicare la propria attività proteolitica a livello di determinate proteine denominate Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-receptor protein Attachment (SNARE).

Le proteine SNARE sono delle componenti del complesso di attracco e di fusione delle vescicole sinaptiche per il trasporto del neurotrasmettitore acetilcolina (Ach). La proteolisi del complesso blocca l'esocitosi della molecola, che non può essere rilasciata, e di conseguenza inibiscono la contrazione muscolare sia liscia che striata a valle del segnale, inducendo una paralisi flaccida (Barr, *et al.*, 2005). ^[1; 3]

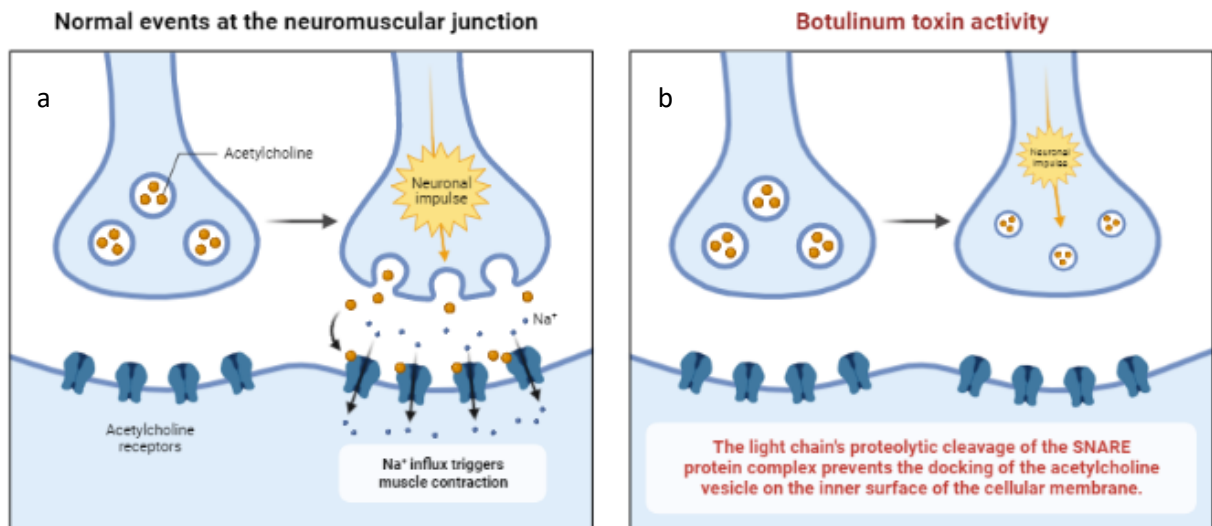


Figura 3. Confronto tra una condizione fisiologica (3a) di esocitosi di acetilcolina da parte di una giunzione neuromuscolare e una condizione patologica (3b) indotta dalla presenza di neurotossina che invece ne blocca il rilascio inducendo paralisi flaccida. [7]

In condizioni fisiologiche la membrana dell'assone si depolarizza e l'acetilcolina viene rilasciata nella fessura sinaptica (Figura 3a). Alla base del meccanismo di esocitosi del segnale chimico c'è il complesso proteico SNARE che media la fusione delle vescicole di trasporto con la membrana delle sinapsi (Figura 4). Le tossine botuliniche mediando il taglio di specifiche proteine del complesso SNARE riducono la stabilità del complesso di aggancio e di fusione tra la superficie interna della membrana cellulare e le vescicole sinaptiche di trasporto dell'acetilcolina impedendone quindi il rilascio (Figura 5).

Si ipotizza che le BoNT agiscano in tre fasi (Barr, et al., 2005): [1; 2; 3]

1. Legame extracellulare: la catena pesante della neurotossina si lega con elevata specificità e selettività alle strutture glicoproteiche delle membrane cellulari delle terminazioni nervose colinergiche;
2. Internalizzazione della BoNT;
3. Legame della catena leggera ai siti bersaglio a livello delle SNARE e taglio delle proteine in siti sierotipo-specifici (Figura 5).

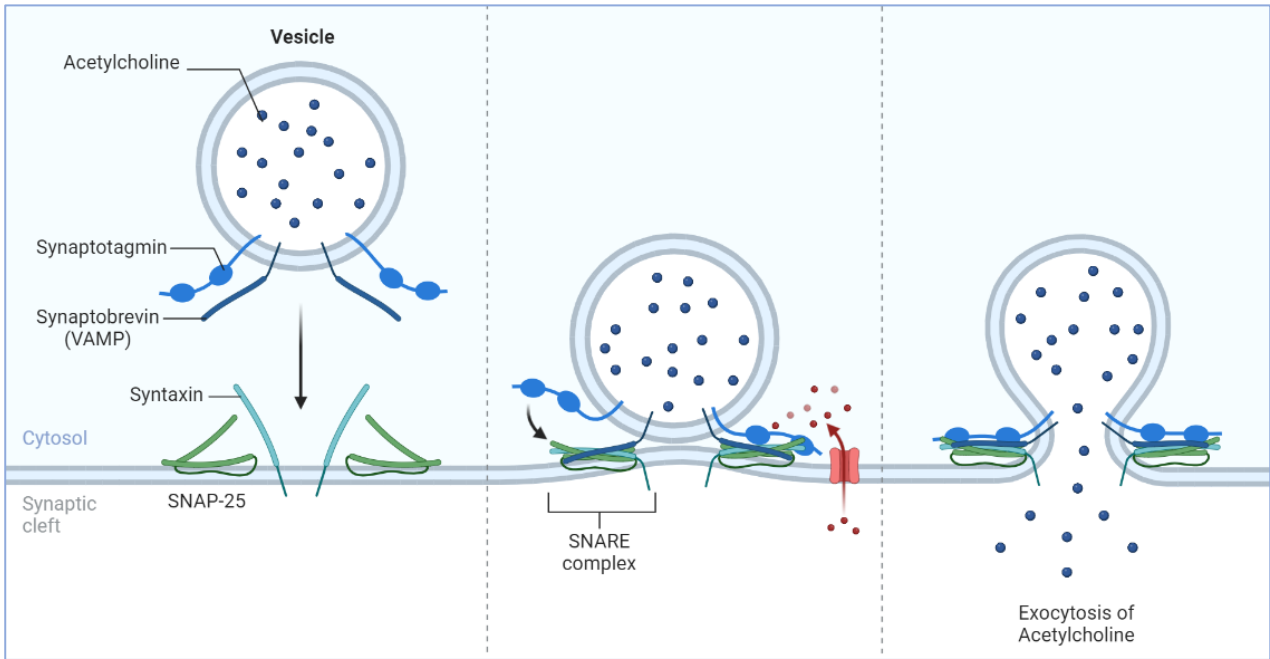


Figura 4. Fusione delle vescicole sinaptiche in condizioni di normale funzionalità. [7]

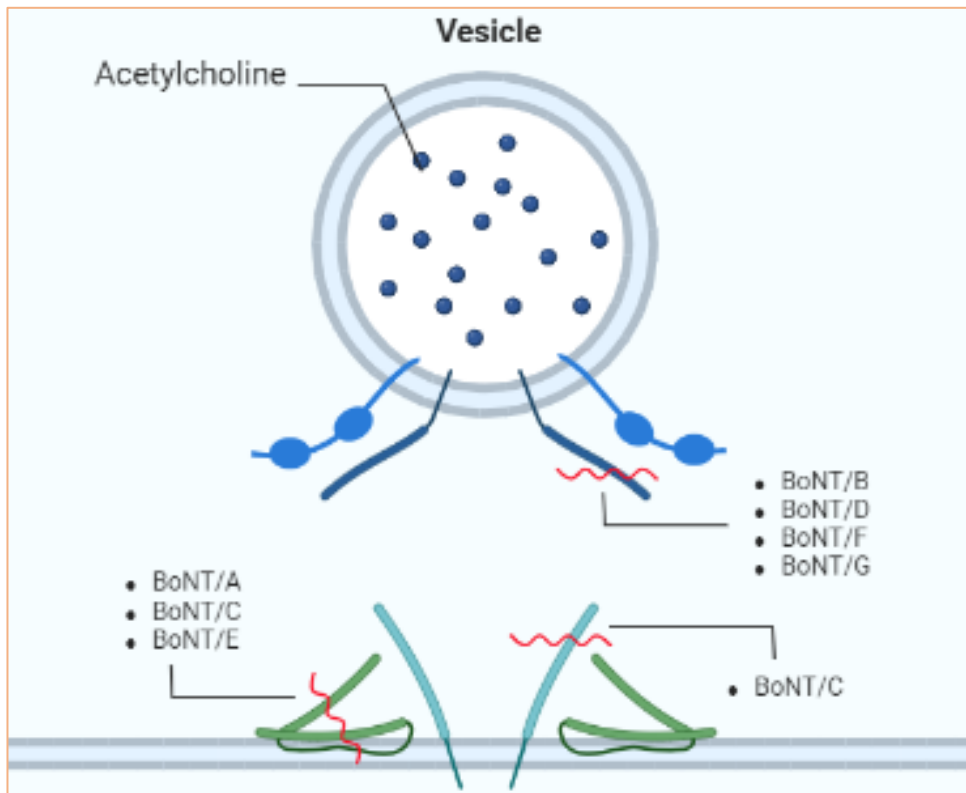


Figura 5. Interruzione della fusione delle vescicole sinaptiche ad opera dell'attività proteolitica caratteristica delle tossine botuliniche. [7]

L'attività proteolitica delle BoNT è altamente specifica ed interessa legami peptidici unici all'interno della sequenza bersaglio nel complesso SNARE e in particolare nelle proteine SNAP-25 o VAMP2. Nella tabella seguente vengono riportate le proteine e i siti di clivaggio dei diversi sierotipi di tossina (Peck *et al.*, 2011; Dressler *et al.*, 2022; Pirazzini *et al.*, 2017).

Tossina	N° siti bersaglio	Proteina bersaglio	Sito di clivaggio (n° α -AA)	Note:
BoNT/A	1	SNAP-25	197	Associata ai sinaptosomi
BoNT/B	1	VAMP 2	78	Chiamata anche sinaptobrevina 2
BoNT/C	2	SNAP-25	198	Associata ai sinaptosomi
		Sintassina	252	
BoNT/CD	2	SNAP-25	198	Associata ai sinaptosomi
		Sintassina	252	
BoNT/D	1	VAMP 2	61	Chiamata anche sinaptobrevina 2
BoNT/DC	1	VAMP 2	61	Chiamata anche sinaptobrevina 2
BoNT/E	1	SNAP-25	180	Associata ai sinaptosomi
BoNT/F	1	VAMP 2	60	Chiamata anche sinaptobrevina 2
			56	
BoNT/G	1	VAMP 2	83	Chiamata anche sinaptobrevina 2

Tabella 2. Riassunto dei siti di attacco di ogni proteina (Barr *et al.*, 2005; Dressler *et al.*, 2022). ^[1; 3]

La manifestazione fisiologica di queste reazioni cellulari dipende dal tessuto bersaglio. Quando il tessuto interessato dalla riduzione dell'attività di neurotrasmissione è un muscolo, si osserva una paresi per denervazione chimica; invece, se il tessuto bersaglio è una ghiandola esocrina, cessa o viene ridotta la secrezione ghiandolare (Peck *et al.*, 2011; Dressler *et al.*, 2022).

1.4. SORVEGLIANZA E CONTROLLI IN FILIERA

Il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB) è l'ente afferente all'Istituto Superiore di Sanità che coordina il sistema di sorveglianza nazionale dei nuovi casi di botulismo nel territorio italiano. ^[4; 8]

Il CNRB fa parte del Sistema Gestione Qualità del Dipartimento SANV ed è accreditato da ACCREDIA per l'utilizzo di due metodiche diagnostiche per l'indagine di tossine botuliniche e clostridi produttori: ^[2; 4; 9; 10]

- CNRB 30.013 - Rev3: metodo colturale e *mouse test* per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche e per la ricerca di tossine botuliniche;
- CNRB 31.013 - Rev3: metodo per la ricerca dei soli clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR.

Gli organi europei e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) valutano l'impatto della filiera alimentare sulla salute umana. In particolare, hanno un ruolo fondamentale nel monitoraggio delle incidenze delle malattie a trasmissione alimentare (MTA) e delle patologie legate alla nutrizione. ^[8]

I casi di botulismo di origine alimentare sono un'emergenza per la salute pubblica e presentano un elevato rischio soprattutto se derivati dal consumo di cibi di produzione industriale, perché distribuiti su larga scala. Per questo motivo le filiere agroalimentari sono tenute a seguire precisi protocolli di igienici su prodotti alimentari e mangimi.

Il "botulinum cook" è una procedura di trattamento termico minimo che le aziende della filiera alimentare applicano ai cibi in scatola con livelli di acidità bassi con condizioni di conservazione favorevoli alla germinazione delle spore dei clostridi e alla potenziale

⁸ Istituto Superiore di Sanità, 2021. Centro nazionale di riferimento per il botulismo. [Online] Available at: <https://www.iss.it/cnr-b-il-centro-nazionale-di-riferimento> [Consultato il giorno 22/11/2022].

⁹ Dipartimento sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria, s.d. ISS-SPVA N RL CNRB 30.013-Rev3 - Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche e per la ricerca di tossine botuliniche (metodo colturale e *mouse test*). [Online] Available at: <https://www.iss.it/documents/20126/8159535/Metodo+CNRB30.013.pdf/6481393f-dfbd-2dfc-fda1-7d814ee0c74d?t=1674468668175>

¹⁰ Dipartimento sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria, s.d. ISS-SPVA N RL CNRB 31.013-Rev 3 - Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR, s.l.: s.n.

produzione di tossine botuliniche. Il processo prevede il mantenimento del cibo ad una temperatura di 121°C per almeno 3 minuti (Peck *et al.*, 2011).

I botulini maggiormente implicati nelle intossicazioni alimentari e con una maggiore resistenza alla temperatura sono i *Clostridium botulinum* del gruppo I. Filogenicamente il gruppo I è equivalente alla specie non neurotossica *Clostridium sporogenes* che quindi può essere utilizzata dalle industrie come *test* per l'efficacia dei processi di conservazione degli alimenti (Brunt *et al.*, 2016).

Per evitare intossicazioni tra i consumatori ogni alimento potenzialmente contaminato viene immediatamente ritirato dal mercato e vengono diramate segnalazioni nei centri di distribuzione affinché anche i prodotti acquistati vengano eliminati. Grazie a queste procedure di sicurezza e ai sistemi di controllo del rischio impiegati nelle aziende di rado si registrano casi di botulismo alimentare associati a prodotti industriali, viceversa si osserva una incidenza importante, seppure non allarmante, di casi associati al consumo di prodotti artigianali o prodotti conservati a temperature non idonee. ^[1; 4]

Gli scenari di rischio emergenti rilevati in Italia e attualmente monitorati dall'ISS sono: ^[3]

- ***Gli studenti fuori sede***: per lo più maschi delle regioni del sud Italia, che portano con sé conserve alimentari casalinghe. Il numero dei casi è contenuto ma in aumento.
- ***La popolazione immigrata***: I casi non indicano un'emergenza ma sono in aumento soprattutto per i soggetti maschi nei periodi successivi alle vacanze nei paesi di origine da cui portano con sé prodotti tipici non adatti alla conservazione alla temperatura ambientale del nostro territorio.
- ***Consumo di alimenti multi-ingrediente***: riguarda quasi esclusivamente i panini farciti con salse e creme artigianali. Queste creme risultano un rischio se prodotte miscelando in maniera non appropriata ingredienti con caratteristiche chimico-fisiche diverse poco compatibili.
- ***Preparazione domestica di alimenti etnici***: tra questi i prodotti fermentati a lunga conservazione (mesi o anni) da mantenere a temperatura ambiente. Una fermentazione corretta produce prodotti sicuri, ma rivisitazioni che prevedano la diminuzione delle quantità di sale e di aceto o la conservazione a temperature non idonee rappresentano un pericolo a causa della possibile germinazione dei Clostridi.

1.5.NORMATIVA PER IL BENESSERE ANIMALE

La normativa vigente in materia di benessere animale che spinge la ricerca verso la validazione di tecniche diagnostiche alternative che riducano la sofferenza e l'utilizzo di animali da laboratorio.

L'attuale *gold standard* per la ricerca di tossina botulinica è una prova di letalità su topo. La sperimentazione in vivo presenta diverse criticità dal punto di vista etico a causa dell'end point del processo biologico coincidente con la morte degli animali testati.

Nel 2010 l'Unione Europea ha emanato la direttiva numero 63 per la protezione degli animali usati a scopo sperimentale. ^[11]

20.10.2010

IT

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

L 276/33

DIRETTIVE

DIRETTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO
del 22 settembre 2010
sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici
(Testo rilevante ai fini del SEE)

Figura 6. Direttiva europea 2010/63/UE, normativa di riferimento in materia di benessere animale impiegato nelle sperimentazioni scientifiche. ^[11]

Applicando questa normativa i Paesi membri si impegnano a rispettare il benessere animale, a ridurre il numero di cavie impiegate e a rimpiazzare il loro utilizzo con tecniche strumentali, per quanto possibile, applicando il "principio delle tre R": replace, reduce e refine.

¹¹ Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2010. Direttiva 2010/63/ue del parlamento europeo e del consiglio. [Online] Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN>

Il principio pone l'interesse su diversi aspetti legati alla cura degli animali in ambienti laboratoriali:

1. Rimpiazzare (Replace): si devono preferire procedure alternative ai *test* animali, qualora ciò non fosse possibile si utilizza la specie più idonea al confronto con il modello designato ma con il minore sviluppo neurologico e comportamentale.
2. Riduzione (Reduce): si deve utilizzare il minor numero di animali pur mantenendo la robustezza statistica dell'analisi.
3. Perfezionare (Refine): gli operatori devono prevedere di usare ogni accortezza utile a ridurre al minimo le sofferenze, lo stress e i danni permanenti agli animali.

La morte animale è l'*end point* che, per quanto possibile deve essere evitato. Nei casi in cui non si possa evitare questa conclusione della procedura sperimentale, come per l'attuale ricerca di tossina botulinica, l'operatore deve in ogni caso impegnarsi a ridurre al minimo le sofferenze non necessarie attraverso la soppressione mediante eutanasia alla comparsa di segni clinici o altri indicatori che segnalano inequivocabilmente la futura morte dell'animale a causa della sperimentazione. L'interruzione precoce dell'esperimento mediante eutanasia eseguita da operatori specializzati tutela il benessere animale secondo il principio "Refine" senza però inficiare l'esito sperimentale (Barr *et al.*, 2005).

La direttiva 2010/63/UE tutta, ma in particolar modo l'articolo 4, specificano che gli Stati membri debbano propendere per l'impiego di metodiche strumentali tali da evitare l'uso di animali vivi, ove possibile, mentre l'Unione Europea si impegna a spingere la ricerca verso la sperimentazione di tecniche alternative. ^[11]

La metodica di cui tratteremo nei successivi capitoli rientra nei progetti di ricerca finanziati per validare metodi alternativi alla sperimentazione animale per la diagnostica di tossina botulinica in diverse matrici, alimentari e non solo (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2016).

1.6.METODI PER LA RILEVAZIONE DELLE TOSSINE:

Gli attuali metodi per la rilevazione delle tossine botuliniche includono un *test* biologico sui topi e altre prove non accreditate come: immunoassorbimento enzimatico (ELISA), cromatografia di immunoaffinità e peptidi fluorogenici. Di questi, il *test* di letalità su topo risulta essere il *gold standard* validato ed accreditato a livello europeo mentre le altre tecniche possono essere eseguite come screening preliminari ma i risultati devono essere confermati con la prova *in vivo* (Barr *et al.*, 2005; Ruge *et al.*, 2011).

Il vantaggio dell'utilizzo dei *test* di *screening* rispetto all'analisi biologica è sicuramente la rapidità, anziché dover attendere tre o quattro giorni, l'analista può fornire un risultato preliminare già dopo una giornata. In Tabella 3 sono presentati i principali vantaggi e svantaggi dell'applicazione delle varie metodiche.

Tecnica	Vantaggi	Svantaggi
Letalità su topo	LoD 1 DL ₅₀ Rileva le 7 BoNT Sensibilità di 1 DL ₅₀	Tempi lunghi Soppressione di topi Sensibile a interferenti
ELISA	LoD 10 DL ₅₀ Risultati in un giorno	Non rileva tutte le BoNT Sensibilità inferiore Falsi positivi e negativi
Cromatografia di immunoaffinità	LoD < di 1 DL ₅₀	Non verificato su tutte le tossine
Peptidi fluorogenici	Risultati in un giorno	Non rileva tutte le BoNT Falsi positivi e negativi

Tabella 3. Confronto tra le specifiche dei metodi di screening e il test gold standard di letalità su topi (Barr *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2005).

Le analisi alternative condotte fino ad oggi hanno prodotto risultati interessanti nonostante alcune limitazioni dei metodi, la principale problematica risiede nella discriminazione della tossina attiva o non (Boyer *et al.*, 2005).

1.6.1. *Gold standard*

Viene definito *gold standard* la migliore tecnica diagnostica validata e usata come riferimento, perchè adatta a verificare i risultati sospetti con buona sensibilità e specificità per le tossine attive (Cardoso *et al.*, 2014). [2; 4]

L'esecuzione del *test* consiste in un'iniezione intraperitoneale di campione adeguatamente trattato (Figura 7). Se la soluzione somministrata contiene almeno una dose letale di tossina botulinica le cavie mostreranno sintomi di intossicazione e moriranno.

Grazie alle normative per la tutela degli animali da laboratorio, dopo la somministrazione della tossina si prevede la soppressione dei topi che manifestino l'insorgenza dei primi sintomi gravi che confermino l'intossicazione. A dosi elevate di tossina i topi sviluppano uno stato di malessere entro otto ore dall'inoculo, ma a dosi basse il decorso può essere più lungo, per questo motivo viene predisposta l'osservazione delle cavie per quattro giorni, e solo in seguito si può procedere con la verbalizzazione di un risultato negativo (Barr *et al.*, 2005).

La prova biologica su topo può essere anche utilizzata per determinare il sierotipo della tossina botulinica testata attraverso l'aggiunta di anticorpi specifici per la neutralizzazione di un sierotipo alla soluzione iniettata. Infatti, i topi verranno suddivisi in gruppi, ad ognuno dei quali si prevede di iniettare il campione infetto con un antidoto specifico per un solo tipo di tossina. Solo i topi a cui verrà iniettato l'anticorpo anti-BoNT corretto per la neutralizzazione della tossina presente in soluzione risulteranno asintomatici e sopravvivranno, tutti gli altri moriranno in quattro giorni. Per ciascuna prova è previsto anche il trattamento al calore del campione (da escludersi per i campioni di siero), essendo le BoNT delle tossine termolabili la mancanza di tossicità del campione sottoposto a bollitura conferma la presenza di una sostanza neurotossica termolabile (Barr *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2005).

Il *gold standard* misura la tossina attiva con elevata sensibilità, anche se la quantità assoluta rilevata non viene ben definita, ma stimata intorno a 10-20 pg/mL per BoNT/A. I principali svantaggi della metodica operativa della prova biologica sono: la soppressione di molti animali, la necessità di tempo per poter determinare la quantità e il tipo di tossina, la necessità di uno stabulario idoneo alle condizioni di salute dei topi; l'iniezione su animale pone a rischio l'operatore e inoltre alcuni clostridi possono produrre tossine non botuliniche che provocano comunque la morte nei topi (Barr *et al.*, 2005).

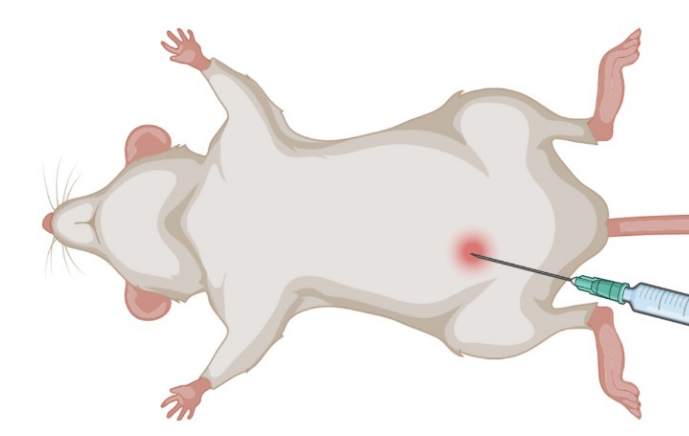


Figura 7. Grafica del punto di iniezione previsto dalla metodica: “Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche e per la ricerca di tossine botuliniche (metodo colturale e mouse test)” – ISS-SPVA N

RL CNRB 30.013 - Rev3. [2; 7; 9]

Molti comitati etici istituzionali, che operano per la tutela nella cura e nell'uso degli animali, richiedono che gli animali da laboratorio vengano soppressi dopo l'insorgenza di sintomi gravi, che quindi implicino grande sofferenza nel soggetto e la morte imminente (Barr *et al.*, 2005).

1.7.METODI INNOVATIVI: MALDI-TOF TECNICA ENDOPEP-MS

Molti sforzi sono stati fatti negli ultimi anni con l'intento di sviluppare metodi alternativi alla prova di letalità in topo ma con scarsi risultati. La maggior parte dei *test* sviluppati ha mostrato infatti una minore sensibilità rispetto a quello classico che accoppiata all'incapacità di fornire informazioni sull'attività della tossina, non li rende idonei a sostituire la prova biologica su topo.

Il metodo EndoPep-MS è una tecnica innovativa sviluppata nei primi anni 2000 dai ricercatori del Centers for Disease Control and Prevention di Atlanta e consiste in un'analisi di spettrometria di massa per la rilevazione della presenza di tossina attiva in diverse tipologie di campioni, che viene concentrata grazie all'utilizzo di specifici anticorpi. Mediante questa procedura è quindi possibile, non solo valutare la presenza delle tossine ricercate in modo specifico, ma anche misurare la loro attività registrando una sensibilità e una specificità paragonabili e in alcuni casi anche superiori al *gold standard*. Per questo motivo l'utilizzo del metodo EndoPep-MS permetterebbe di ridurre drasticamente o addirittura soppiantare l'uso della prova biologica su topo (Barr *et al.*, 2005; Drigo *et al.*, 2020; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2016).

La procedura inizialmente sviluppata si basava su strumentazione molto performante ma costosa e utilizzabile solo da personale specializzato. Recenti studi ne hanno dimostrato la fattibilità anche su strumenti meno performanti ma di comune utilizzo nei laboratori di microbiologia clinica come gli spettrometri di massa MALDI-TOF, che attualmente vengono impiegati per analisi di routine per l'identificazione batterica (Boyer *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2011; Kalb *et al.*, 2015; Kalb *et al.*, 2006; Drigo *et al.*, 2020; Perry *et al.*, 2017).

Nello specifico il metodo EndoPep-MS valuta l'attività proteolitica delle BoNT attraverso l'utilizzo di peptidi sintetici che mimano i naturali substrati delle tossine. La presenza di tossina nel campione viene confermata dalla visualizzazione grafica dei frammenti peptidici, i quali vengono registrati dallo strumento come picchi con rapporti di massa su carica specifici che ne permettono il differenziamento (Barr *et al.*, 2005; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2016).

La tecnica analitica prevede che i peptidi sintetici specifici vengono incubati con il campione in cui si sospetta la presenza di BoNT in un buffer di reazione con tempi e temperature di incubazione specifici per ciascuna tossina. Successivamente i prodotti peptidici dell'attività

proteolitica della tossina e il peptide intero, se presenti vengono rilevati mediante spettrometria di massa a tempo di volo di ionizzazione con desorbimento laser assistita da matrice (tecnologia MALDI-TOF, acronimo per l'appunto di "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight") (Barr *et al.*, 2005; Drigo *et al.*, 2020; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2016).

Questo metodo permette quindi di combinare due fattori importanti (Drigo *et al.*, 2020):

1. la specificità biologica del taglio proteolitico eseguito da ogni tossina botulinica;
2. l'elevata capacità di rilevamento della spettrometria di massa.

2. SCOPO:

L'elaborato espone una tecnica diagnostica alternativa alla prova biologica di letalità animale, attualmente gold standard, per la rilevazione di tossina botulinica in diverse matrici.

La sperimentazione è stata condotta presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie di Treviso, un ente sanitario facente parte del Servizio Sanitario Nazionale che svolge attività di controllo, sorveglianza e ricerca scientifica, oltre a fornire servizi specializzati negli ambiti della salute animale, dei rischi alimentari e delle zoonosi. In particolare, la sezione di Treviso si occupa anche di attività di autocontrollo su alimenti per quanto riguarda la ricerca di tossine botuliniche e di clostridi produttori di tossine botuliniche mediante prova biologica e metodi molecolari.

Lo scopo del lavoro consisteva nel validare la procedura EndoPep-MS, una tecnica diagnostica innovativa basata sulla spettrometria di massa inizialmente sviluppata al *Centers for Disease and Control di Atlanta*, utilizzando lo strumento MALDI *Biotyper sirius* (Bruker).

La metodica originale è stata sviluppata e validata su spettrometri di massa ad alta risoluzione, che richiedono specifiche *skills* da parte degli utilizzatori e risulta perciò difficilmente applicabile in un laboratorio di microbiologia diagnostica. Viceversa, il MALDI è uno spettrometro che non richiede particolari competenze da parte del personale utilizzatore e viene sempre più impiegato nei laboratori sia ospedalieri che degli IZS per l'identificazione di batteri e funghi filamentosi.

Pertanto, gli obiettivi specifici del progetto erano:

- Mettere a punto il metodo Endopep-MS sulla strumentazione MALDI *Biotyper sirius* per la rilevazione della presenza di tossine botuliniche di tipo "A", "B", "E" ed "F" in matrici alimentari e campioni biologici e di tipo "C" e "D" in campioni di origine animale.
- Validare il metodo sulle matrici maggiormente coinvolte in casi di botulismo umano e animale al fine ultimo di poterlo utilizzare come *test* diagnostico sostitutivo della prova biologica *in vivo*.

L'utilizzo routinario dell'EndoPep-MS presenta diversi vantaggi, tra cui l'eliminazione del vincolo del *test in vivo*, di conseguenza questo comporterebbe una diminuzione drastica del numero di animali utilizzati a fini scientifici/diagnostici e dei costi associati a strutture

attrezzate con uno stabulario e personale specializzato per la manipolazione degli animali; infatti, questa tecnica diagnostica ha un basso costo di esecuzione se comparata con il *gold standard*.

Un ulteriore vantaggio importante di questo tipo di metodica è la notevole riduzione delle tempistiche di diagnosi per i casi sospetti di botulismo, determinando una rapida somministrazione della terapia a supporto del paziente e un ritiro immediato dei lotti contaminati, qualora la tossina venisse rilevata in prodotti alimentari commerciali, evitando così ulteriori casi di botulismo.

3. MATERIALI E METODI

In questo capitolo si tratteranno i materiali e metodi applicati alla sperimentazione. Verranno fornite informazioni relative all'esecuzione della nuova procedura sperimentale con metodo EndoPep.

3.1. MATERIALI

Il metodo EndoPep prevede l'utilizzo e la preparazione di alcune soluzioni necessarie per l'esecuzione dell'analisi. Di seguito verranno introdotte le principali sostanze utilizzate:

- **Tossine:**

Le tossine botuliniche utilizzate sono dei complessi proteici in soluzione distinti nei sierotipi A, B, C, D, E ed F. Le BoNT utilizzate appartengono sia a lotti acquistati nel 2022 sia a lotti utilizzati nella precedente validazione del 2017, tutti forniti dalla ditta Metabiologics con una concentrazione di 1 mg/mL e una DL₅₀ nota e certificata dall'azienda stessa.

Nelle seguenti tabelle vengono introdotte le caratteristiche principali e fondamentali per fini analitici delle tossine, differenziate per anno di acquisizione dei lotti.

Tossine utilizzate					
Tossina	mg/mL	In soluzione	DL ₅₀ /mL	pH	Conservazione
BoNT/A	1.0	<i>Sodio fosfato e sodio cloruro</i>	3.7 * 10 ⁷	7.4	2-8°C per 6 mesi
BoNT/A	1.0	<i>PBS</i>	3.5 * 10 ⁷	7.0	-20°C
BoNT/B	1.0	<i>Sodio fosfato e sodio cloruro</i>	1.15 * 10 ⁶	7.4	2-8°C per 6 mesi
BoNT/C	1.0	<i>Sodio fosfato e sodio cloruro</i>	7.0 * 10 ⁶	7.4	2-8°C per 6 mesi
BoNT/C	1.0	<i>PBS</i>	6.5 * 10 ⁶	7.0	-20°C
BoNT/D	1.0	<i>Sodio fosfato e sodio cloruro</i>	2.9 * 10 ⁷	7.4	2-8°C per 6 mesi
BoNT/D	1.0	<i>PBS</i>	3.0 * 10 ⁷	7.0	-20°C
BoNT/E	1.0	<i>Sodio fosfato e sodio cloruro</i>	3.0 * 10 ⁷	7.4	2-8°C per 6 mesi
BoNT/F	1.0	<i>PBS</i>	5.0 * 10 ⁶	7.0	-20°C

Tabella 4. Caratteristiche delle tossine e conservate in 100 mM sodio fosfato e 50 mM sodio cloruro o PBS. (MetabioLogics Inc., 2014; MetabioLogics Inc., 2022) ^[12]

○ **Peptidi:**

L'analisi di spettrometria di massa, come detto, si basa sul rilevamento del segnale delle due porzioni del peptide tagliato dalle BoNT. Nella Tabella 5 sono riportate le sequenze dei peptidi utilizzati nella sperimentazione, le relative specifiche e il punto di clivaggio.

¹² Certificati di analisi delle tossine A, B, C, D, E ed F sia dei lotti 2013-2014 e del 2022, MetabioLogics Inc.

Peptide	Ditta	[M]	Sequenza Amminoacidica (α -AA)
Pep-21	CRIBI	3,25	RGSNKPKIDAGNQRATR{NLE}LGGR
Pep-B	JPT	2,58	H-LSELDDRADALQAGASQFETSAAKLKRKYWWKNLK-OH
Pep-C	GenScript	6,66	KGSNRTRIDEANQRATRMLGG{Lys(biotin)}
Pep-C39	GenScript	11,9	VKYNIDEAQNKAS{ORN}MGIRRR
Pep-D/F	GenScript	2,30	TSNRRLQQTQAQVDEVVDIMRVNVDKVLERDQKLSSELDDRADAL (BoNT-D taglia K/L; BoNT-F taglia Q/K)
Pep-E	GenScript	4,95	WWWAKLGQEIDTRNRQKD{hArg}MAKADSMKR

Tabella 5. Peptidi utilizzati per ogni BoNT con in evidenza il sito di clivaggio specifico (Barr et al., 2005; Perry et al., 2017; GenScript, 2013-2015; JPT, 2013-2015; CRIBI, 2013-2015). ^[13]

I peptidi C e C39 per il rilevamento della tossina C sono stati testati entrambi producendo risultati riproducibili e idonei all'analisi, ma si è deciso di operare solo con Pep-C che è risultato associato a una maggiore sensibilità del metodo.

Nella tabella che segue (Tabella 6) vengono riportati i valori di massa su carica registrati per ogni peptide intero e per le porzioni di peptide tagliato, questi sono valori specifici che le rendono distinguibili tra loro.

Tossina	Peptide	Peptide intero (m/z)		Peptide tagliato (m/z)	
		[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	CT	NT
BoNT/A	Pep 21	2405.1	1203.7	998.7	1426.8
BoNT/B	Pep B	4038.0	2019.8	2297.1	1759.9
BoNT/C	Pep C	2912.3	1457.1	1059.5	1870.9
BoNT/D	Pep D/F	2605.4	1941.8	1217.3	4013.5
BoNT/E	Pep E	3713.6	1857.8	1133.6	2598.3
BoNT/F	Pep D/F	2605.4	1941.8	1345.5	3883.5

Tabella 6. Segnale massa su carica (m/z) dei peptidi interi e dei frammenti ottenuti per l'attività di clivaggio della tossina corrispondente. Leggenda: [M+H]⁺ = segnale del peptide monoprotonato; [M+2H]²⁺ = segnale del peptide diprotonato; CT = segnale della catena C terminale; NT = segnale della catena N terminale.

○ **Anticorpi:**

¹³ Certificati di analisi dei peptidi 21, B, C, D/F ed E anno 2013 – 2015 GenScript, JPT e CRIBI

Nella seguente tabella vengono riportati gli anticorpi (Ab) utilizzati per la cattura e la concentrazione delle tossine:

Tossina:	BoNT A	BoNT B	BoNT C	BoNT D	BoNT E	BoNT F
Ab 1:	RAZ1	2B18.2	8DC1.2	8DC1.2	4E17.1	6F5
Ab 2:	CR2	B12.2	4C2	4C2	/	/

Tabella 7. Anticorpi (Ab) utilizzati per la cattura e concentrazione delle tossine

Gli Ab sono stati forniti in soluzioni a concentrazione nota di 1 mg/mL in PBS o in buffer di PBST + Tris-glicina dall'Università della California e in particolare dal *team* del Professor Marks. Essi vengono conservati alla temperatura di -80 ± 10 °C mentre un piccolo quantitativo in base alle analisi previste viene biotinilato e coattato su biglie magnetiche Dynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen Life technologies) secondo la procedura riportata nel sotto-capitolo relativo.

○ **Reaction Buffer:**

È la soluzione di attivazione per la reazione di EndoPep-MS. Si compone di cinque sostanze fondamentali, di cui vediamo le concentrazioni nell'elenco sottostante:

- HEPES buffer 10 mM
- Cloruro di zinco 0,2 mM
- BSA 1 mg/mL
- DTT 0,1 M da aggiungere al momento dell'utilizzo
- Acqua ultra-pura per biologia molecolare

○ **Soluzione HCCA:**

L'HCCA è una soluzione sovrasatura di acido α -ciano-4-idrossicinnamico. Ha lo scopo di favorire la ionizzazione delle molecole del campione rendendo possibile l'analisi dei peptidi con una massa superiore a 5 kDa.

La soluzione viene prodotta a partire dalla forma anidra fornita dall'azienda Bruker Daltonics, solubilizzando ogni μ g di polvere in un quantitativo equivalente in μ L di Bruker standard solvent, cioè una miscela di acetonitrile (50%), acqua deionizzata (47,5%) e acido trifluoroacetico (2,5%).

- **Soluzione PBST e PBSD**

Le soluzioni di tampone fosfato salino vengono preparate a partire da precise quantità di: cloruro di sodio (NaCl), cloruro di potassio (KCl), idrogenofosfato di disodio (Na_2HPO_4) e diidrogenofosfato (KH_2PO_4).

Il PBS-Tween (PBST) viene fornito dall'azienda Sigma sottoforma di polvere da diluire in acqua per ottenerne la concentrazione desiderata.

- **Peptide Calibration Standard II**

Soluzione fornita dall'azienda Bruker Daltonics e utilizzata per la calibrazione dello strumento MALDI *Biotyper sirius* secondo il protocollo fornito dalla ditta stessa.

3.2 METODI

Nei successivi sotto-capitoli di questa sezione si discuteranno le metodiche utilizzate per la messa a punto del metodo EndoPep e i passaggi esecutivi della sperimentazione in particolare:

- Biotinilizzazione degli anticorpi specifici
- Cattura e concentrazione della tossina con le biglie coattate con gli anticorpi
- Rilevazione delle tossine mediante Endopep-MS
- Analisi con MALDI-TOF MS
- Valutazione della sensibilità analitica del metodo
- Valutazione della specificità dell'anticorpo legato a biglie e le rispettive tossine
- Valutazione del limite di rilevabilità su campioni contaminati artificialmente
- Ricerca della tossina in matrici incognite

3.2.1 Biotinilizzazione degli anticorpi specifici e legame alle biglie magnetiche

Il legame degli anticorpi con le biglie è stato eseguito seguendo il protocollo gentilmente fornitoci dalla Dott.ssa Suzanne R. Kalb (*Center for Disease and Control, Atlanta*). Tale procedura prevede la biotinilazione dell'anticorpo e il successivo legame con le biglie coattate con streptavidina.

Nel caso gli Ab siano risospesi in buffer Tris-Glicina prima di procedere con la biotinilizzazione è necessario sostituire il buffer con PBSD seguendo il protocollo fornito dalla ditta produttrice delle colonnine Zeba Spin Desalting da 0,5 mL.

La procedura per il cambio buffer prevede di porre le colonnine in un tubo di raccolta e di centrifugare per 1 minuti a 1500xg dopo averne rimosso la chiusura inferiore e allentato il tappo superiore, al fine di eliminare la soluzione di mantenimento.

Seguono 3 lavaggi con 300 μ L di PBSD con centrifugazioni sempre di 1 minuto a 1500 x g per eliminare la soluzione di scarto nel tubo di raccolta. Infine, centrifugare per eliminare l'eccesso di liquido e trasferire la colonnina in una provetta.

Versare 100 μ L di anticorpi nella colonnina, centrifugare per ottenere degli anticorpi con il buffer corretto nella provetta e scartare la colonnina.

Una volta ottenuti gli anticorpi nel corretto buffer è possibile procedere con la biotinilazione che prevede la preparazione iniziale di una soluzione 10 mM di sulfo-NHS-biotina, aggiungendo 224,0 μ L di acqua ultrapura ad una monodose da 1 mg di polvere anidra fornita dall'azienda ThermoFisher. Dalla soluzione 10 mM vengono prelevati 16 μ L da diluire ulteriormente in 284,0 μ L di acqua ultrapura, ottenendo una soluzione 0,533 mM. In una provetta da 0,5 mL, miscelare 8 μ L di un anticorpo con 1 μ L di soluzione di biotina al 0,533 mM.

Per biotinilare l'anticorpo è necessario incubare la miscela ottenuta *overnight* a temperatura ambiente senza agitare, riponendo la provetta in un ambiente chiuso al riparo dalla luce.

Il giorno successivo, al termine dell'incubazione, per ogni anticorpo biotinilato si predispongono 3 provette da 1,5 mL con 100 μ L di biglie magnetiche M-280 Streptavidin Dynabeads (Invitrogen). Con un supporto magnetico si catturano le biglie, attendendo che il liquido di mantenimento in cui erano disciolte diventi trasparente (circa 1-2 minuti) per rimuoverlo. Quindi eseguire 2 lavaggi delle biglie con 500 μ L di buffer HBS-EP.

In ogni provetta con biglie magnetiche aggiungere 2,3 μ L di ciascun Ab biotinilato e 400 μ L di soluzione HBS-EP (ottenendo una concentrazione di 2 μ g per 100 μ L di biglie) e incubare la miscela per 1 h 30' su un agitatore orbitale Stuart SB2 a 30 rpm.

Al termine dell'incubazione rimuovere il liquido catturando le biglie con il supporto magnetico ed eseguire 2 ulteriori lavaggi con 500 μ L di buffer HBS-E. Infine, risospendere le biglie lavate in 100 μ L di buffer HBS-EP, unire i volumi delle 3 provette dello stesso anticorpo e conservare in frigo a circa 4 °C fino all'utilizzo.

3.2.2 Cattura e concentrazione della tossina con le biglie coattate con gli anticorpi

Il metodo Endopep comprende in una fase preliminare che prevede la cattura e la concentrazione delle tossine. Il metodo prevede di prelevare 500 μ L di campione (siero, estratto in tampone fosfato gelatina, brodocoltura) e riporlo in una provetta tipo Eppendorf da 1,5 mL a cui aggiungere 50 μ L di PBST e 20 μ L di biglie magnetiche coattate con gli anticorpi specifici per la tossina in esame. La soluzione viene incubata per 1 h a temperatura ambiente in agitatore orbitale Stuart SB2 a 30 rpm.

Al termine dell'incubazione la tossina si troverà adesa alle biglie per cui risulta necessario utilizzare il supporto magnetico per eliminare il surnatante ed eseguire dei lavaggi, due con 1 mL di PBST, uno con 150 μ L di PBST e l'ultimo con 80 μ L di acqua ultrapura per biologia molecolare.

Le biglie così pulite vengono risospese in 18 μ L di RB buffer in provette di tipo Eppendorf da 0,2 mL. L'analisi prosegue come riportato al paragrafo 3.2.3.

3.2.3 Rilevazione delle tossine mediante Endopep-MS

Per la rilevazione delle tossine nel campione di biglie sospese come descritto nel paragrafo precedente (3.2.2 Cattura e concentrazione della tossina con le biglie coattate con gli anticorpi) il metodo Endopep prevede di aggiungere 2 μ L di una soluzione 150 mM (15 mM finale) del peptide specifico per la tossina ricercata.

Le soluzioni vengono incubate in termociclature secondo le condizioni di tempo e temperatura idonee per l'attivazione delle tossine, come riportato in tabella 8. Al termine dell'incubazione risospendere le biglie e trasferire 1 μ L di soluzione nell'apposito supporto per campioni dello strumento MALDI *Biotyper sirius* (Bruker Daltonics). A goccia asciutta aggiungere 1 μ L di matrice HCCA. Lasciare asciugare completamente il target con i campioni e procedere alla lettura del campione come riportato nel paragrafo 3.2.4.

Tossina	Peptide	Temperatura	Tempo (ore)
BoNT/A	Pep 21	37 °C	4
BoNT/B	Pep B	37 °C	4
BoNT/C	Pep C	37 °C	17
BoNT/D	Pep D/F	42 °C	17
BoNT/E	Pep E	37 °C	4
BoNT/F	Pep D/F	37 °C	4

Tabella 8. Temperature e tempi di incubazione specifici per ciascuna BoNT ricercata.

3.2.4 Analisi con MALDI-TOF MS

Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando lo strumento *Biotyper sirius* (Bruker Daltonics) ed il software FlexControl versione 3.4 (Bruker Daltonics) con un range di lettura da 620 a 5020 m/z . Ciascuno spettro è stato acquisito in positive linear mode con una frequenza del laser di 200 Hz e una potenza del 30%. Per ciascun campione lo spettro finale è stato ottenuto dalla somma di 1000 shots ottenuti in gruppi di 100 in 10 diversi punti del campione.

3.2.5 Valutazione della sensibilità analitica del metodo in soluzione

La sensibilità analitica del metodo viene valutata mediante due prove di infezione manuale di aliquote d'acqua ultrapura per biologia molecolare, al fine di valutare il limite di rilevabilità del metodo (LoD, Limit of detection) in condizioni controllate prive di interferenti.

In questo sottocapitolo si tratta la prima analisi che prevede la diluizione in acqua ultrapura delle tossine in modo da ottenerne una concentrazione iniziale di 1024 $DL_{50}/\mu L$, calcolandone i volumi grazie alle concentrazioni iniziali fornite dal venditore e riportate in Tabella 4. Da questa soluzione diluita eseguire ulteriori diluizioni in base 2 fino alla concentrazione finale di 0,125 $DL_{50}/\mu L$.

Dosare 2 μL di ciascuna diluizione in provette di tipo Eppendorf da 0,2 mL con 2 μL del rispettivo peptide alla concentrazione 150 mM e 16 μL di RB, e incubare secondo le condizioni di tempo e temperatura riportate in Tabella 8.

Al termine dell'incubazione 1 μL di ogni soluzione viene aliquotato sei volte nell'apposito supporto per campioni dello strumento MALDI *Biotyper sirius* e addizionato di 1 μL di matrice HCCA, per predisporre delle repliche tecniche dell'analisi da cui ricavare il limite di rilevabilità del metodo.

Una volta asciutti i campioni possono essere analizzati secondo le indicazioni del paragrafo 3.2.4.

Per ogni tossina vengono eseguite delle repliche biologiche, ripetendo la sperimentazione almeno due volte.

La Figura seguente raccoglie i punti salienti della procedura analitica.

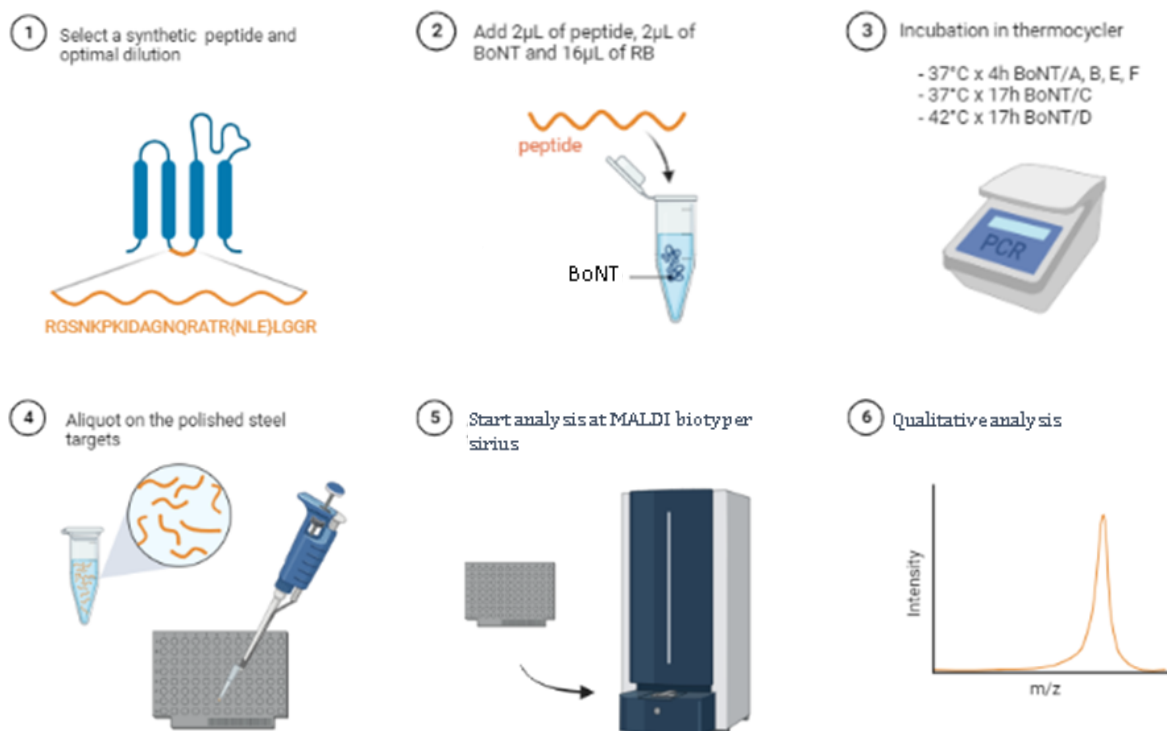


Figura 8. Rappresentazione grafica della metodica EndoPep-Ms 11.1) selezione del peptide sintetico adatto alla tossina target e selezione della diluizione ottimale dello stesso; 11.2) aggiunta dei reagenti; 11.3) incubazione in termociclature delle soluzioni con tempistiche e temperature idonee; 11.4) preparazione del piastrellino metallico aliquotando i campioni e la matrice HCCA; 11.5) scansione del piastrellino al MALDI Biotyper sirius 11.6) analisi qualitativa di presenza assenza il peptide intero e i prodotti di taglio della tossina.

[7]

3.2.6 Valutazione della sensibilità analitica del metodo con anticorpi

La seconda analisi per verificare la sensibilità analitica del metodo prevede di eseguire un'infezione manuale di 500 µL di acqua ultrapura con diluizioni scalari di tossina, selezionate in prossimità del LoD in soluzione evidenziato durante la prima verifica della sensibilità, indicativamente tra le 2 e i 0,125 DL₅₀/mL. La soluzione infettata deve essere trattata con 20 µL di anticorpi specifici (prodotti come riportato nel capitolo 3.2.1) addizionati in base alle combinazioni riportate nella Tabella 9.

a. Tossine alimentari			b. Tossine animali		
Tossina	Anticorpo	Quantità (μL)	Tossina	Anticorpo	Quantità (μL)
BoNT/A	RAZ1	10	BoNT/C	8DC1.2	10
	CR2	10		4C2	10
BoNT/B	2B18.2	10	BoNT/D	8DC1.2	10
	B12.2	10		4C2	10
BoNT/E	4E17.1	20			
BoNT/F	6F5	20			

Tabella 9. anticorpi utilizzati per ogni tossina (BoNT) con rispettivo quantitativo a) tossine che normalmente interessano uomo e alimenti; b) tossine che normalmente interessano animali e mangimi.

Come si nota le tossine A, B, C e D utilizzano due diversi anticorpi specifici, ognuno aggiunto in egual proporzione per raggiungere il quantitativo finale di 20 μL di anticorpi.

In provetta tipo Eppendorf da 1,5 mL infettare 500 μL di acqua ultrapura per biologia molecolare con la tossina designata. Aggiungere 50 μL di PBST e 20 μL di biglie magnetiche coattate con gli anticorpi specifici per la tossina in esame secondo le combinazioni riportate in Tabella 9. Incubare la soluzione per 1 h a temperatura ambiente in agitatore orbitale Stuart SB2 a 30 rpm.

Al termine dell'incubazione utilizzare il supporto magnetico per catturare le biglie ed eliminare il surnatante. Lavare con 1 mL di PBST per due volte, poi con 150 μL di PBST e con 80 μL di acqua ultrapura per biologia molecolare.

Risospendere le biglie in 18 μL di RB buffer in provette di tipo Eppendorf da 0,2 mL e proseguire l'analisi come riportato al paragrafo 3.2.3 e 3.2.4.

Anche in questa fase analitica viene calcolato il limite di rilevabilità eseguendo repliche tecniche e biologiche.

3.2.7 Valutazione della specificità dell'anticorpo legato a biglie e le rispettive tossine

La valutazione della specificità viene eseguita analizzando concentrazioni fisse di ciascuna tossina (128 DL₅₀) catturata con gli anticorpi specifici legati alle biglie magnetiche come riportato in Tabella 9, ma l'incubazione deve essere eseguita con tutti i peptidi non specifici

per quella determinata tossina. Processare i campioni come descritto nel capitolo precedente 3.2.6.

3.2.8 Valutazione del limite di rilevabilità su campioni contaminati artificialmente

Per testare il limite di rilevabilità del metodo Endopep in matrici complesse è necessario selezionare dei campioni negativi da infettare manualmente. In questa analisi si sono selezionate le seguenti soluzioni precedentemente processate in IZSve e risultate negative per la presenza delle tossine:

- siero bovino;
- brodocolture da vegetali;
- brodocoltura da insaccato;
- paté di olive commerciale;
- carne in scatola commerciale;
- mangime secco per cani

Le matrici non liquide (mangime, carne in scatola e paté) prima di procedere con la contaminazione devono essere trattate con tampone fosfato gelatina (TFG) in rapporto 1:1, omogeneizzate e sottoposte ad incubazione in frigo per un'ora, al termine della quale è possibile procedere con una centrifugazione per separare la fase liquida analizzabile dal pellet che invece deve essere eliminato. Da tutte le fasi liquide delle matrici aliquotare 500 µL in provette Eppendorf da infettare con diluizioni scalari vicine al LoD verificato nella prova di sensibilità di ciascuna tossina e procedere come descritto nel paragrafo 3.2.6.

3.2.9 Applicazione del metodo Endopep su campioni incogniti

Al fine di valutare la sensibilità e la specificità diagnostica del metodo è fondamentale testare campioni incogniti sia negativi che positivi, per questo sono stati analizzati in cieco un totale di 28 campioni contaminati dall'Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo dell'ISS e 9 campioni negativi precedentemente analizzati con tecniche ufficiali dall'IZSve.

I campioni vengono processati come descritto nei paragrafi 3.2.2., 3.2.3, 3.2.4.

Campioni ISS	
Codice campione	Fonte
13	Peperoni
14	
15	
4	Pollo
7	
8	Manzo
10	
11	
12	Pesce
19	
21	Melanzane
26	Carote
27	
31	Zucchine
32	
33	Olive
34	
36	
37	Brodocolture
38	
40	
42	
46	
47	
49	
50	
56	
59	

Campioni IZS	
Codice campione	Fonte
/	Siero bovino
/	paté di olive commerciale
/	carne in scatola commerciale
/	mangime secco per cani
431	brodocoltura da vegetali
218	
212/1 e 2	
398/3	brodocoltura da insaccato

Tabella 10. Campioni forniti per l'analisi applicativa del metodo Endopep

In questa fase si è analizzato anche un campione di brodo da insaccato risultato naturalmente contaminato da CPTB in Real time-PCR. Per questa matrice è stata condotta un'analisi in parallelo sia con la tecnica *gold standard* con letalità su topo sia con metodo EndoPep descritto.

Per comprendere i dati raccolti e per completare questa fase si sono divisi i risultati in veri positivi, falsi positivi, veri negativi e falsi negativi al fine di calcolare sensibilità, specificità e accuratezza diagnostiche, valore predittivo positivo e negativo. Le formule utilizzate per il calcolo sono riportate di seguito. ^[14]

Sensibilità diagnostica:

$$\frac{\text{N° veri positivi}}{\text{N° veri positivi} + \text{N° falsi negativi}} * 100$$

Specificità diagnostica:

$$\frac{\text{N° veri negativi}}{\text{N° veri negativi} + \text{N° falsi positivi}} * 100$$

Accuratezza diagnostica:

$$\frac{\text{N° veri positivi} + \text{N° veri negativi}}{\text{N° veri positivi} + \text{N° falsi positivi} + \text{N° falsi negativi} + \text{N° veri positivi}} * 100$$

Valore predittivo positivo (VPP):

$$\frac{\text{N° veri positivi}}{\text{N° veri positivi} + \text{N° falsi positivi}} * 100$$

Valore predittivo negativo (VPN):

$$\frac{\text{N° veri negativi}}{\text{N° veri negativi} + \text{N° falsi negativi}} * 100$$

¹⁴ MedCalc Software Ltd, s.d. Medcalc. [Online] Available at: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php [Consultato il giorno 2023].

4. RISULTATI

Questo capitolo raccoglie i risultati analitici ottenuti nelle diverse fasi della sperimentazione precedentemente descritte.

Per determinare la qualità degli spettri ottenuti al MALDI *Biotyper sirius* è stato fondamentale osservare l'intensità dei picchi e il *signal to noise ratio* (S/N) ossia il rapporto tra il segnale e il rumore di fondo. In particolare, il S/N è fondamentale per determinare il limite di rilevabilità, infatti, uno spettro è da considerarsi indicativo per la presenza della tossina quando almeno un picco tra CT o NT presenta un valore di S/N maggiore o uguale a 3; limite al di sotto del quale il picco stesso non risulta distinguibile dal rumore di fondo dello strumento.

Altra considerazione fondamentale per la contestualizzazione dei dati ottenuti è il limite di rilevabilità osservato nella prova biologica su topo che corrisponde alla somministrazione di 1 mDL₅₀/μL.

4.1 VALIDAZIONE PRELIMINARE DEL METODO

In questa fase si sono eseguite delle valutazioni preliminari per individuare le migliori condizioni di esercizio per lo strumento MALDI *Biotyper sirius*. In particolare, sono stati valutati i parametri relativi alla concentrazione del peptide sintetico e all'intensità del laser.

In una prima analisi si sono testate le concentrazioni del peptide 15 mM, 6 mM, 4,5 mM, 3 mM e 1,5 mM mantenendo l'intensità del laser 28%, come da protocollo standardizzato nello spettrometro di massa in uso in precedenza.

Durante l'analisi si è osservato che tutte le concentrazioni permettevano di evidenziare il picco ma che tale picco raggiungeva l'intensità desiderabile $\geq 10^4$ solo utilizzando concentrazioni superiori o uguali a 4,5 mM. Tra le concentrazioni testate però l'intensità e la risoltezza dei picchi registrati era migliore alla concentrazione di 15mM.

Nell'immagine successiva si osservano gli spettri ottenuti dall'analisi MALDI-TOF dei peptidi di interesse (Pep-21, PepB, PepC, PepE e PepD/F) con concentrazione 15 mM.

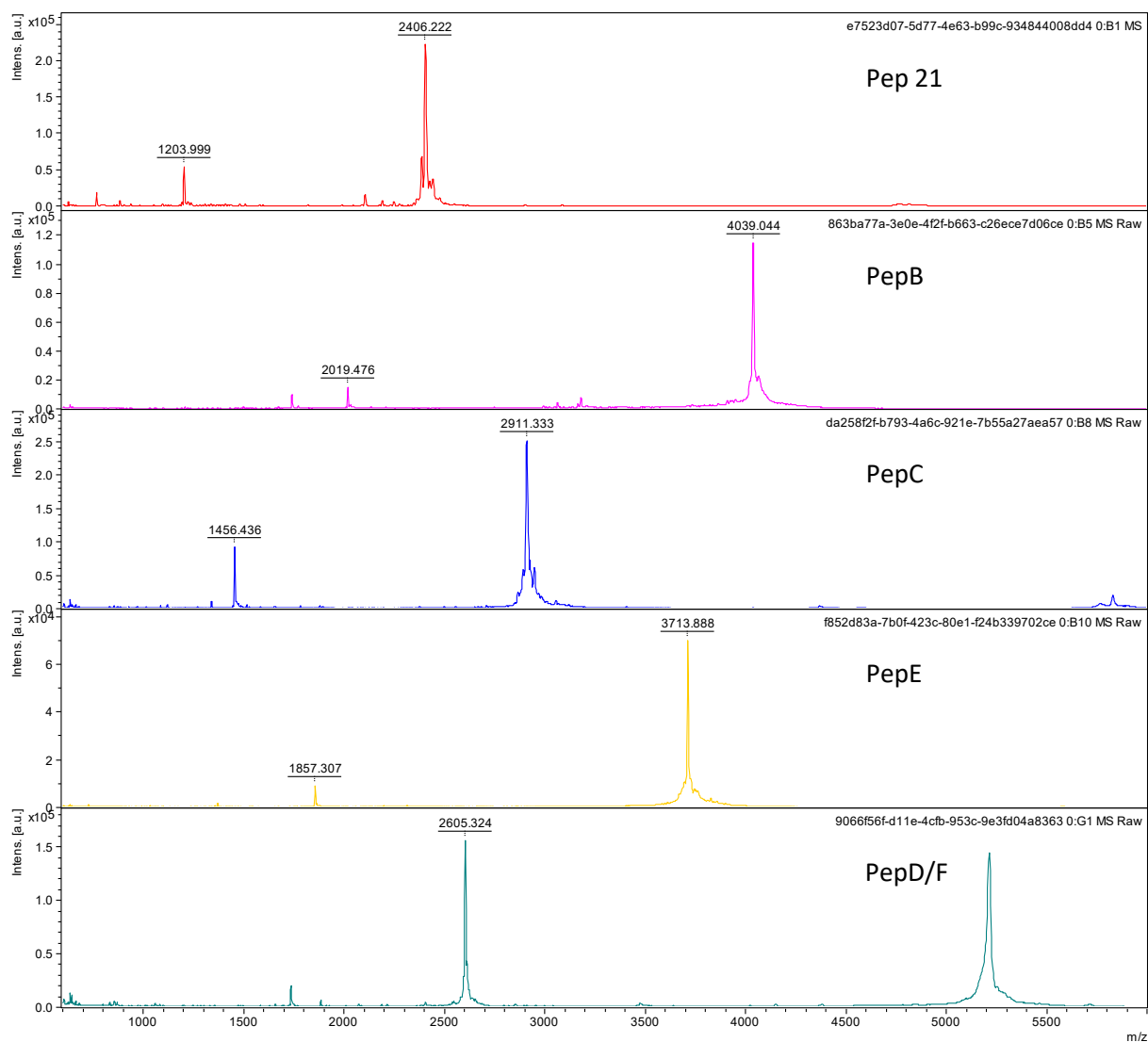


Figura 9. Spettri di massa dei 5 peptidi testati alla concentrazione 15 mM. 12.a) Spettro Pep21, 12.b) Spettro PepB, 12.c) Spettro PepC, 12.d) Spettro PepE, 12.e) Spettro Pep D/F.

Dall'immagine si può notare che il *range* di acquisizione è maggiore di quello di interesse; infatti, in un secondo momento è stato ridimensionato ai valori riportati nel capitolo "materiali e metodi".

A questo punto è stata eseguita una prova ulteriore di rilevazione di ciascuna tossina utilizzando il laser con intensità al 28%, al 20% e al 14% e combinando questo fattore con i peptidi alle concentrazioni di 15 mM, 4,5 mM e 1,5 mM al fine di confermare le osservazioni precedentemente raccolte. La reazione è stata eseguita in termociclatore a 37 °C per 4 ore e per ogni analisi si sono eseguite tre repliche tecniche in modo da dare robustezza al dato sperimentale ottenuto.

La prima prova è stata eseguita utilizzando concentrazioni scalari della di BoNT/A da 1024 a 0,125 LD₅₀ in soluzione sodio fosfato e sodio cloruro e l'influenza del parametro in esame è stata valutata considerando le variazioni del limite di rilevazione del metodo (LoD). Nella tabella seguente si osservano i risultati ottenuti dall'analisi.

Intensità laser	Concentrazione Pep-21	LoD (DL ₅₀)
14%	15 mM	0,5
	4,5 mM	2
	1,5 mM	4
20%	15 mM	0,5
	4,5 mM	2
	1,5 mM	8
28%	15 mM	0,5
	4,5 mM	2
	1,5 mM	4

Tabella 11. Confronto tra i limiti di rilevabilità della BoNT/A riscontrati utilizzando differenti intensità del laser e differenti concentrazioni del peptide 21.

Dai risultati ottenuti si è confermata la non idoneità della concentrazione 1,5 mM del peptide, in quanto i valori risultavano notevolmente superiori al limite di rilevabilità del *gold standard*. La concentrazione di 4,5 mM risultava accettabile ma associata a un LoD più alto rispetto alla prova biologica su topo, mentre la concentrazione ottimale di peptide è risultata di 15 mM.

Per quanto riguarda l'intensità del laser, osservando gli spettri rilevati per piccole concentrazioni di tossina è possibile notare che in tutti i casi i picchi risultano separati con una buona risoluzione e con pochi interferenti.

Considerando il segnale maggiore a 998 *m/z* corrispondente al frammento peptidico C-terminale, si può notare che l'intensità registrata come output dello strumento aumenta al crescere dell'intensità del laser utilizzata e di conseguenza aumenta la sensibilità del metodo. Al contempo non si sono evidenziate correlazioni tra l'intensità del laser e il valore del signal to noise ratio (S/N) (Figura 10). Nonostante queste considerazioni l'analisi non ha prodotto esiti nettamente differenziati tra loro, infatti l'intensità del segnale si è sempre attestata con

ordine di grandezza 10^4 e dunque accettabile. Nell'ottica di risparmio del laser si è però deciso di procedere all'analisi delle altre tossine utilizzando solo le intensità del 20 e del 14%. Inoltre, grazie alle considerazioni dedotte dalla neurotossina A si è optato per testare i peptidi solamente alle concentrazioni 4,5 mM e 15 mM. I risultati sono osservabili nella tabella 12 che segue.

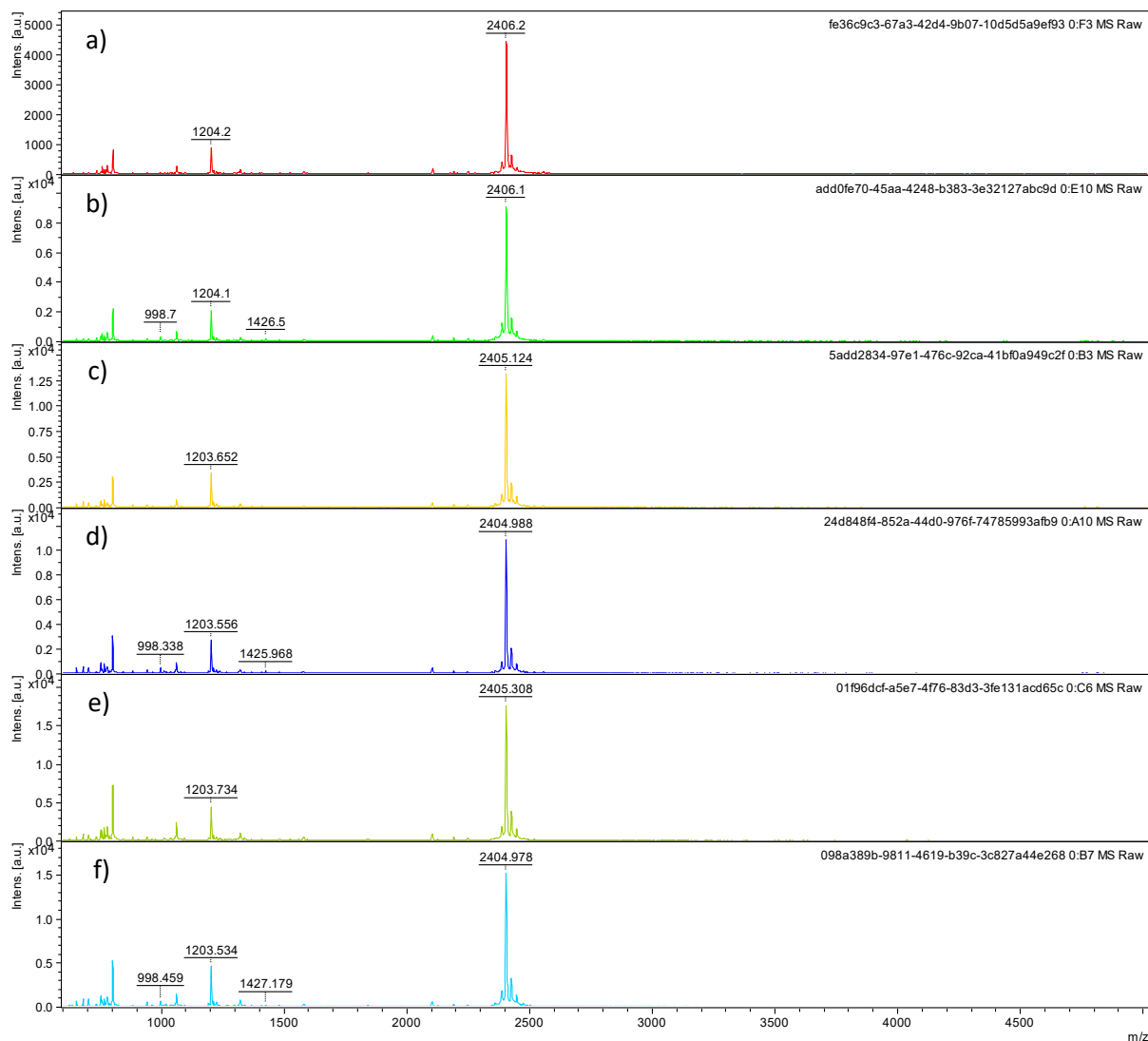


Figura 10. Spettri di massa a diversa intensità di laser di BoNT/A alla concentrazione di 2 $DL_{50}/\mu L$ e peptide 21 con concentrazione 15 mM. 13.a) Spettro di peptide 21 ottenuto con laser al 14%, 13.b) Spettro dell'attività della tossina A con laser al 14%, 13.c) Spettro del peptide 21 con laser 20%, 13.d) Spettro dell'attività della tossina A con laser al 20%, 13.e) Spettro del peptide 21 con laser 28%, 13.f) Spettro dell'attività della tossina A con laser al 28%.

BoNT/B + PepB		
	DL ₅₀ /mL con laser 14%	DL ₅₀ /mL con laser 20%
4,5mM	1	0,25
15mM	0,5	0,5
BoNT/E + PepE		
	DL ₅₀ /mL con laser 14%	DL ₅₀ /mL con laser 20%
4,5mM	1	1
15mM	0,5	0,25
BoNT/F + PepD/F		
	DL ₅₀ /mL con laser 14%	DL ₅₀ /mL con laser 20%
4,5mM	1	1
15mM	0,25	0,125

*Tabella 12. Sensibilità delle tossine utilizzate per l'analisi.
In grassetto le combinazioni che hanno portato ai migliori risultati.*

Da tutte le prove preliminari eseguite è quindi emerso che le condizioni ottimali per la rilevazione delle tossine prevedono l'utilizzo del peptide alla concentrazione di 15 mM in combinazione all'intensità del laser al 20%. Tali condizioni sono state utilizzate anche per la rilevazione delle tossine C e D.

4.2 VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ ANALITICA DEL METODO IN SOLUZIONE

Basandosi sulla validazione preliminare si sono individuate le modalità di esecuzione della tecnica EndoPep-MS da applicare a tutte le tossine.

Le prove di sensibilità analitica sono state eseguite diluendo la tossina in acqua e facendola reagire con il peptide senza la concentrazione della stessa mediante cattura con le biglie magnetiche coattate con anticorpi specifici per ciascuna, come riportato nel sotto-capitolo 3.2.5 di “Materiali e Metodi”.

Nell'immagine si riportano gli spettri delle diluizioni scalari della tossina A:

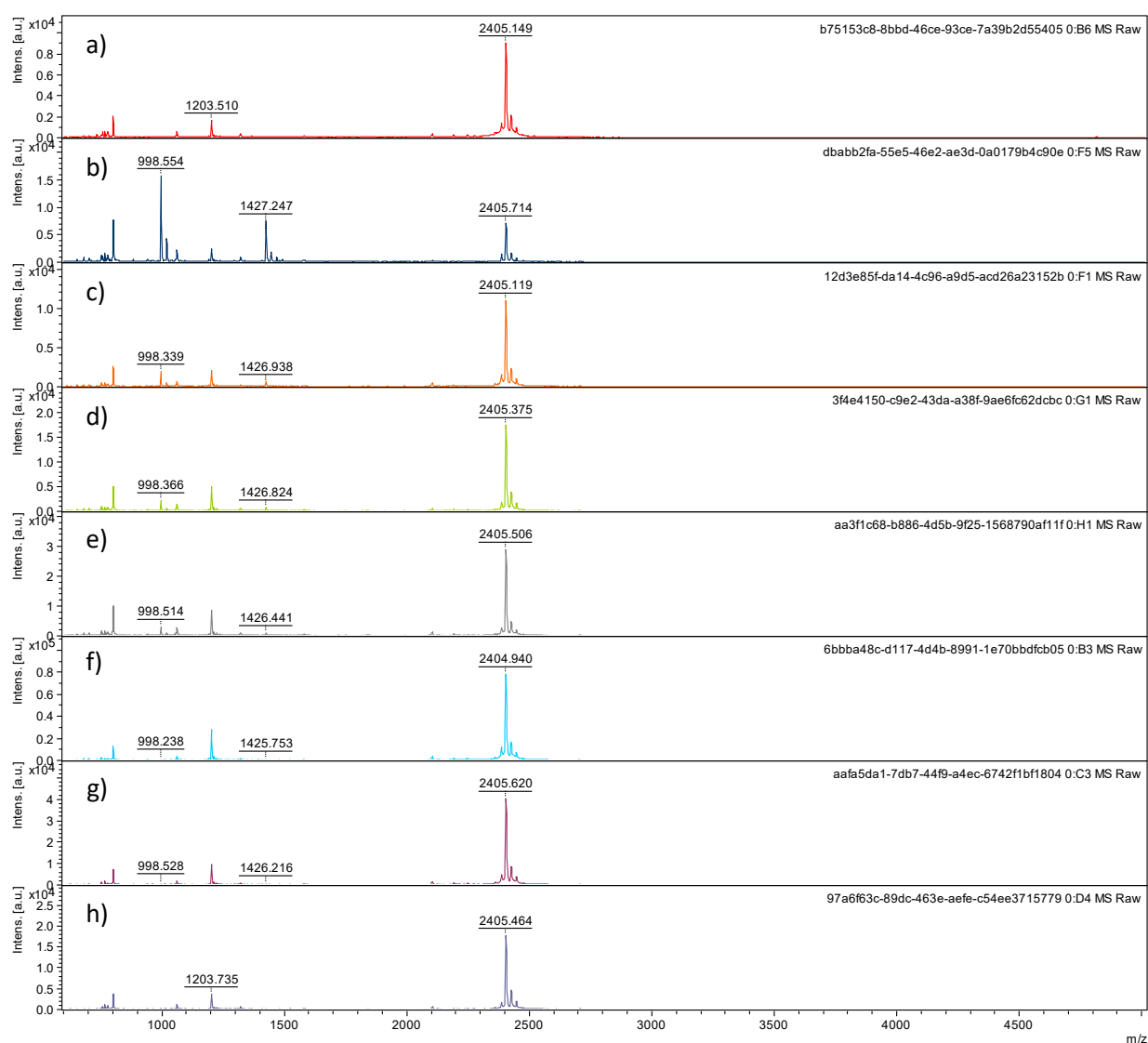


Figura 11. Confronto tra spettro di peptide 21 intero 15mM (a) e gli spettri delle diluizioni progressive in base 2 della tossina botulinica (da b ad h), dalla concentrazione 128 DL₅₀/μL a 2 DL₅₀/μL.

Per ogni analisi della tossina in soluzione si sono eseguite repliche tecniche, analizzando il campione 3 o 6 volte, e biologiche, ripetendo l'analisi in almeno 2 giorni differenti. Questa accortezza è stata necessaria per valutare la precisione del metodo e calcolare il limite di rilevabilità (LoD), ossia la concentrazione di tossina più bassa rilevabile in almeno 3 repliche tecniche di ogni replica biologica. Nella tabella sottostante vengono riportati i valori di LoD in DL₅₀/mL.

Per la rilevazione sono state considerate positive le diluizioni analizzate i cui spettri di massa presentavano almeno uno dei due picchi relativi ai frammenti peptidici (CT ed NT) con un rapporto S/N superiore a 3,0.

TOSSINE IN SOLUZIONE (DL ₅₀)						
	BoNT/A	BoNT/B	BoNT/C	BoNT/D	BoNT/E	BoNT/F
Replica 1	1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,5
Replica 2	1	0,5	0,125	0,5	0,125	0,125
Replica 3	0,5	0,25	0,5	0,5	0,125	0,125
Replica 4	0,5	/	0,5	/	0,125	0,5

Tabella 13. Risultati delle repliche tecniche e biologiche eseguite delle tossine in soluzione

Le prove di sensibilità analitica hanno messo in evidenza come il metodo sia in grado di rilevare la presenza delle tossine in soluzione con una sensibilità paragonabile o superiore al *gold test* rappresentato dalla prova biologica in topo.

Questa metodica è la più semplice prova di sensibilità eseguibile, ciò nonostante, risulta incompleta non tenendo in considerazione della necessità di utilizzare le biglie magnetiche per la cattura delle tossine in matrici complesse. Per le tossine che riscontravano una minore sensibilità del metodo (BoNT/A e C) si è dunque condotta un'ulteriore analisi della sensibilità analitica in soluzione acquosa con l'utilizzo di questo elemento aggiuntivo.

I risultati ottenuti in questa analisi della sensibilità sono stati equivalenti o migliori dell'osservazione in soluzione.

4.3 VALUTAZIONE DELLA SPECIFICITÀ DELL'ANTICORPO LEGATO ALLE BIGLIE E LE RISPETTIVE TOSSINE

Ogni tossina alla concentrazione di 128 DL₅₀ è stata catturata con gli anticorpi specifici corrispondenti (Tabella 9) legati alle biglie magnetiche. L'incubazione invece è stata eseguita con tutti i peptidi, anche quelli specifici per le altre tossine in modo da valutare la specificità dell'attività proteolitica di ogni tossina. In Tabella 14 sono riportati i risultati delle prove di specificità.

	BoNT/A + RAZ1+CR2	BoNT/B + 2B18.2+B12.2	BoNT/C + 8DC1.2+4C2	BoNT/D + 8DC1.2+4C2	BoNT/E + 4E17.1	BoNT/F + 6F5
Pep-21	+	-	-	-	-	-
PepB	-	+	-	-	-	-
PepC	-	-	+	-	-	-
PepD/F	-	-	-	+	-	+
PepE	-	-	-	-	+	-

Tabella 14. Risultati prova di specificità delle tossine legate agli anticorpi per il peptide specifico di ciascuna. "+" = positività per la rilevazione dei segmenti CT e NT del peptide sintetico tagliato; "-" = mancata rilevazione dei frammenti CT e NT del peptide e presenza del solo peptide intero.

Da queste osservazioni è stato evidente che i complessi tossina-anticorpo presentano specificità per i rispettivi peptidi.

4.4 VALUTAZIONE DEL LIMITE DI RILEVABILITÀ SU CAMPIONI CONTAMINATI ARTIFICIALMENTE

Si è quindi proceduto alla rilevazione della sensibilità del metodo su matrici complesse in modo da definire il limite di rilevabilità anche in condizioni non ottimali come potrebbero essere quelle riscontrabili nei campioni di campo naturalmente infettati da *Clostridium botulinum*. La procedura è stata eseguita a partire dalla cattura e concentrazione delle tossine con le biglie magnetiche coattate con anticorpi in tal modo quindi si è valutata anche l'eventuale interferenza nel limite di rilevabilità della fase preanalitica.

Di seguito vengono riportati i risultati ottenuti infettando manualmente siero bovino, brodocoltura da vegetali, brodocoltura da insaccato, paté di olive commerciale, carne in scatola commerciale e mangime secco per cani, ma quest'ultimo relativamente solo alle tossine C e D. Tali matrici sono state selezionate tra quelle più comunemente analizzate in IZSve (siero, brodoculture e mangime) e tra quelle che notoriamente rappresentano matrici complesse sia per la prova biologica che per le metodiche di biologia molecolare e che vengono analizzate di frequente in casi di botulismo umano (siero, paté di olive e carne in scatola).

SIERO + BIGLIE (DL ₅₀ /500μL)					
BoNT/A	BoNT/B	BoNT/C	BoNT/D	BoNT/E	BoNT/F
1U	0,25U	0,25U	0,125U	1U	0,25U
0,5U	1U	0,125U	0,125U	0,5U	0,125U
0,5U	0,5U	0,125U	0,125U	0,5U	0,125U
2U	/	/	0,125U	0,5U	/

Tabella 15. Risultati delle repliche tecniche e biologiche eseguite delle tossine in siero bovino

BRODOCOLTURA DA INSACCATO + BIGLIE (DL ₅₀ /500μL)					
BoNT/A	BoNT/B	BoNT/C	BoNT/D	BoNT/E	BoNT/F
/	0,125U	/	0,125U	0,25U	0,125U
/	0,125U	/	0,125U	0,25U	0,125U
/	0,125U	/	0,125U	0,125U	0,125U
/	0,125U	/	0,125U	0,125U	0,125U

Tabella 16. Risultati delle repliche tecniche e biologiche eseguite delle tossine in brodocoltura da insaccato.

BRODOCOLTURA DA VEGETALI + BIGLIE (DL ₅₀ /500μL)					
BoNT/A	BoNT/B	BoNT/C	BoNT/D	BoNT/E	BoNT/F
/	0,125U	/	0,25U	0,125U	0,125U
/	0,125U	/	0,25U	0,125U	0,125U
/	0,125U	/	0,125U	0,125U	0,125U
/	0,125U	/	0,125U	0,125U	0,125U

Tabella 17. Risultati delle repliche tecniche e biologiche eseguite delle tossine in brodocoltura da vegetale.

CANE IN SCATOLA + BIGLIE (DL ₅₀ /500μL)					
BoNT/A	BoNT/B	BoNT/C	BoNT/D	BoNT/E	BoNT/F
1U	0,125U	0,25U	0,25U	0,125U	0,125U
1U	0,125U	0,25U	0,25U	0,125U	0,125U
4U	0,25U	0,125U	0,125U	0,125U	0,125U
/	0,25U	0,125U	/	/	0,125U

Tabella 18. Risultati delle repliche tecniche e biologiche eseguite delle tossine cane in scatola trattata con TFG.

PATÈ DI OLIVE + BIGLIE (DL ₅₀ /500μL)					
BoNT/A	BoNT/B	BoNT/C	BoNT/D	BoNT/E	BoNT/F
8U	1U	/	0,5U	0,125U	0,125U
8U	1U	/	0,5U	0,125U	0,125U
2U	0,5U	/	0,125U	0,125U	0,125U
2U	0,5U	/	0,125U	0,125U	0,125U

Tabella 19. Risultati delle repliche tecniche e biologiche eseguite delle tossine olive trattate con TFG.

MANGIME IN TFG + BIGLIE (DL ₅₀ /500µL)	
BoNT/C	BoNT/D
1U	1U
0,25U	0,5U
0,25U	1U

Tabella 20. Risultati delle repliche tecniche e biologiche eseguite delle tossine mangime trattato con TFG.

Per quanto riguarda le tossine B, E, F e D il metodo EndoPep-MS è risultato in grado di rilevare la loro presenza in tutte le matrici testate con un LoD compreso tra 1 e 0,125 DL₅₀ quindi valori di sensibilità paragonabili o addirittura più alti di quelli della prova biologica.

Per quanto riguarda la tossina C, essa è stata rilevata con un LoD compreso tra 1 e 0,125 DL₅₀ in carne in scatola, siero e mangime mentre si sono evidenziati problemi di rilevazione in brodocolture e paté di olive dove la presenza di picchi aspecifici ha impedito la corretta identificazione di quelli specifici. Tale risultato non appare comunque particolarmente rilevante se si considera che, rappresentando prevalentemente botulismo animale, la tossina di tipo C viene ricercata quasi esclusivamente nel siero ed eventualmente nei mangimi.

Anche per la tossina A sono stati evidenziati risultati non soddisfacenti per quanto riguarda le brodocolture a causa della presenza di picchi aspecifici che hanno impedito di determinare la presenza o meno della tossina. Per quanto concerne le altre matrici invece la BoNT/A è stata rilevata correttamente ma con valori di LoD mediamente superiori a quelli delle altre tossine ricercate (range 0,5 - 8 DL₅₀) soprattutto per quanto concerne il paté di olive e la carne in scatola.

A questo punto sono state effettuate delle prove per verificare quale fosse il problema che determinava questa difficoltà nel rilevare la tossina A. Dapprima per verificare che non fossero presenti inibitori specifici che interferissero con il legame anticorpo-tossina si è provveduto a contaminare con diluizioni di BoNT/A vicine al limite di rilevabilità del metodo una brodocoltura vegetale e a procedere all'incubazione con il peptide senza la cattura con le biglie magnetiche. Tutti i campioni hanno dato esito negativo indicando che probabilmente la mancata rilevazione della tossina non era dovuta a un problema concernente la reazione tossina-anticorpo ma probabilmente alla presenza di qualche inibitore presente nelle brodocolture. Tale osservazione è stata poi confermata dalle prove di contaminazione e cattura della tossina in acqua ultrapura e in tampone fosfato gelatina, in entrambi i casi, infatti, la tossina è stata rilevata correttamente fino alla concentrazione di 0,5 DL₅₀. Dalle

prove effettuate è quindi emerso che gli anticorpi RAZ1 e CR2 sono funzionali e che l'attività enzimatica della tossina A si rileva in assenza di interferenti anche a basse concentrazioni.

A questo punto è stata condotta un'ulteriore prova nella quale si è proceduto a infettare delle brodocolture, precedentemente riscontrate negative alla presenza di clostridi produttori di tossina botulinica, con un ceppo puro di riferimento di *C. botulinum* tipo A (ATCC19397). In questo caso, probabilmente per l'alta concentrazione della tossina formata, il campione è risultato correttamente positivo (Figura 12).

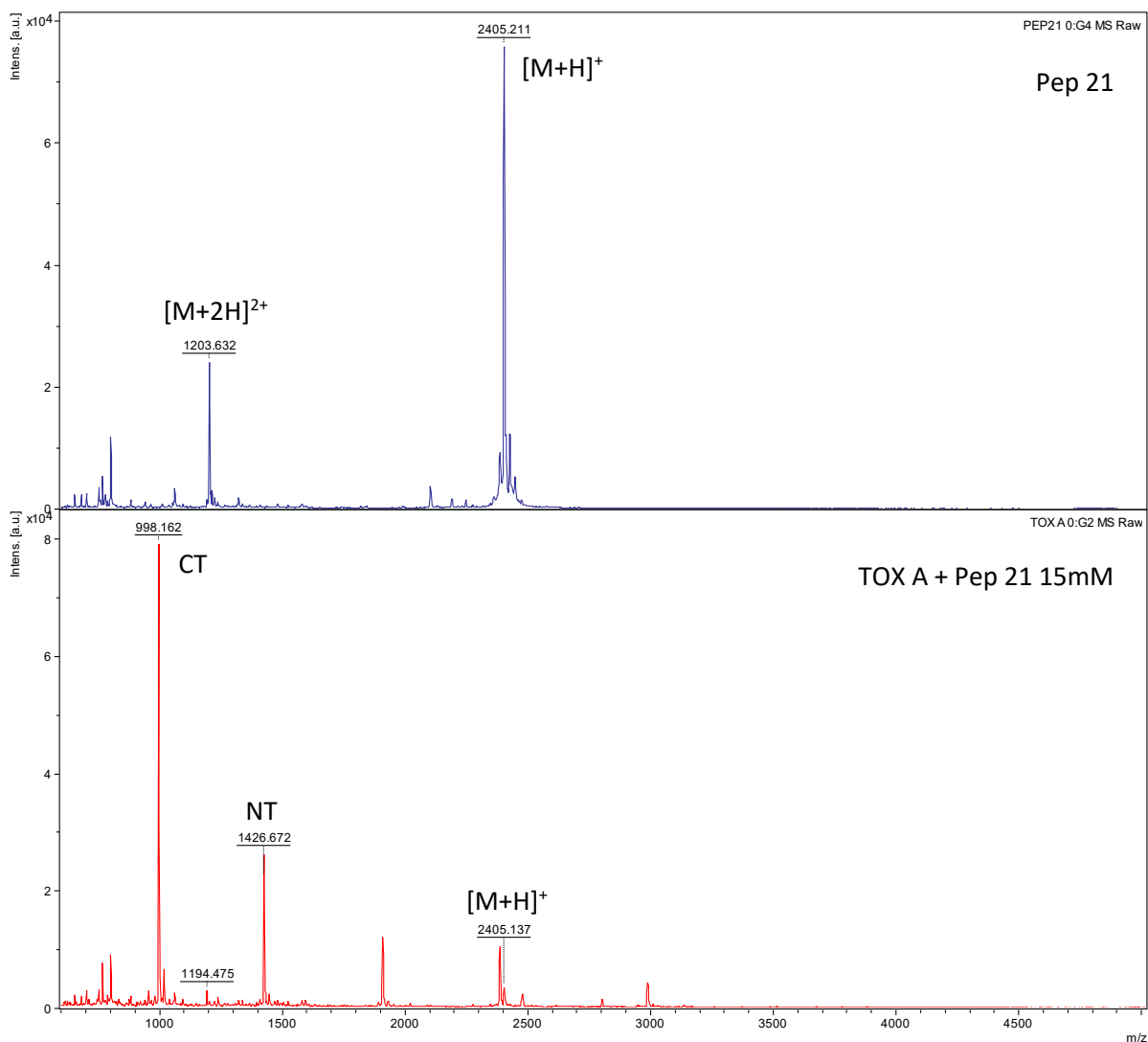


Figura 12. Spettro di massa ottenuto dall'analisi della BoNT/A presente in una brodocoltura artificialmente infettata con il ceppo di riferimento di *Clostridium botulinum* ATCC19397.

È plausibile che i brodi precedentemente testati non abbiano prodotto risultato a causa, per esempio, del pH della soluzione che potrebbe aver determinato un cambio di conformazione della struttura tridimensionale della BoNT/A con una diminuzione dell'efficienza di taglio.

È inoltre possibile che la tossina di riferimento abbia perso titolo e per tale motivo si dovrà procedere con la rivalutazione il titolo, in termini di DL_{50} , mediante prova biologica.

4.5 APPLICAZIONE DEL METODO ENDOPEP SU CAMPIONI INCOGNITI

Per completare la validazione del metodo si sono analizzati 27 campioni ignoti forniti dal Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo dell'Istituto Superiore di Sanità e 9 campioni diagnostici risultati precedentemente negativi alla prova biologica in topo presso l'IZSve. Essendo tutti campioni di alimenti a consumo umano è stata indagata la presenza delle sole tossine A, B, E ed F. Per i campioni dubbi sono state eseguite delle analisi di conferma mediante prova biologica e real-time PCR.

Di seguito vengono riportate le tabelle contenenti i risultati ottenuti dall'analisi e quelli effettivi.

Matrice	Risultato atteso	Esito EndoPep-MS			
		BoNT/A	BoNT/B	BoNT/E	BoNT/F
POLLO	B	-	+	-	-
POLLO	A	+	-	-	-
MANZO	B	-	+	-	-
MANZO	F	-	-	-	+
MANZO	B	-	+	-	-
PESCE	B	-	+	+	-
PEPERONI SOTT'OLIO	A	+	-	-	-
PEPERONI SOTT'OLIO	F	-	-	-	+
PEPERONI SOTT'OLIO	B	-	+	-	-
PESCE	B	-	+	-	-
MELANZANE	A	+	-	-	-
CAROTE	E	-	-	+	-
CAROTE	A	+	-	-	-
ZUCCHINE	E	-	-	+	-
ZUCCHINE	A + E	-	-	+	-
OLIVE	B	-	+	-	-
OLIVE	B	-	+d	-	-
BRODOCOLTURA	B	-	+	-	-
BRODOCOLTURA	A + E	+	-	+	-
BRODOCOLTURA	B	-	+	-	-
BRODOCOLTURA	E	-	-	+	-
BRODOCOLTURA	F	-	-	-	+
BRODOCOLTURA	E	-	-	+	-
BRODOCOLTURA	E	-	-	+	-
BRODOCOLTURA	B	-	+	-	-
BRODOCOLTURA	A	+	+	-	-
BRODOCOLTURA	B	-	+	-	-

SIERO DI BOVINO	NEGATIVO	-	-	-	-
PATE' DI OLIVE	NEGATIVO	-	-	-	-
CARNE IN SCATOLA	NEGATIVO	-	-	-	-
MANGIMEN SECCO PER CANI	NEGATIVO	-	-	-	-
BRODOCOLTURA DA VEGETALI 431	NEGATIVO	-	-	-	-
BRODOCOLTURA DA VEGETALI 218	NEGATIVO	-	-	-	-
BRODOCOLTURA DA VEGETALI 212/1	NEGATIVO	-	-	-	-
BRODOCOLTURA DA VEGETALI 212/2	NEGATIVO	-	-	-	-
BRODOCOLTURA DA INSACCATO	NEGATIVO	-	-	-	-

Tabella 21. Confronto tra i risultati attesi e quelli ottenuti con il metodo EndoPep-MS di campioni incogniti utilizzati per la valutazione dei parametri diagnostici. Leggenda: "+" = positività per la rilevazione di entrambi i picchi CT e NT del peptide tagliato; "-" = mancata rilevazione dei frammenti CT e NT del peptide (S/N <10) e presenza del solo peptide intero; "+d" = campione debole positivo. In rosso vengono indicati gli esiti inattesi.

Nella tabella di seguito riportata sono indicati i risultati di sensibilità (SeD), specificità diagnostica, (SpeD), accuratezza (ACC), valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) dell'EndoPep-MS distinto per ciascuna tossina.

BoNT	SeD Valore (95% CI)	SpeD Valore (95% CI)	VPP Valore (95% CI)	VPN Valore (95% CI)	Accuratezza Valore (95% CI)
A	85.71% (42.13-99.64)	100% (88.06-100)	100% (54.07-100)	96.67% (82.78-99.92)	97.22% (85.47-99.93)
B	100% (71.51-100)	92.00% (73.97-99.02)	84.62% (54.55-98.08)	84.62% (54.55-98.08)	94.44% (81.34-99.32)
E	100% (59.04-100)	96.5% (82.24-99.91)	87.50% (47.35-99.68)	100% (87.66-100)	97.22% (85.47-99.93)
F	100% (29.24- 100)	100% (89.42 -100)	100% (29.24-100)	100% (89.42- 100)	97% (90.26-100)

Tabella 22. Risultati relativi alla sensibilità (SeD), alla specificità diagnostica (SpeD,) al valore predittivo positivo (VPP), al valore predittivo negativo (VPN) e all'accuratezza (ACC) del metodo EndoPep-MS.

I risultati ottenuti dimostrano che i metodi messi a punto presentano dei parametri diagnostici promettenti per l'applicazione nell'attività routinaria anche se dovranno essere

confermati con l'analisi di un numero maggiore di campioni naturalmente contaminati con ciascuna tossina.

Il botulismo di fatto è una patologia piuttosto rara e quindi risulta difficile reperire campioni contaminati naturalmente soprattutto per le tossine E ed F che sono causa di una minima percentuale di casi ogni anno. Il basso numero di campioni positivi naturalmente contaminati attualmente testati è di fatto la causa dell'ampio range dell'intervallo di confidenza al 95% per quanto riguarda la SeD e il VPP e che andrà ricalcolato quando si riuscirà a reperire un numero maggiore di campioni.

5. CONSIDERAZIONI FINALI

Attraverso questa sperimentazione abbiamo potuto constatare che la metodica EndoPep-MS è facilmente eseguibile in un laboratorio di microbiologia clinica e applicabile allo strumento MALDI *Biotyper sirius* con buoni risultati analitici.

Le prove di sensibilità analitica hanno messo in evidenza che il metodo rileva la presenza delle tossine in soluzione acquosa con una sensibilità equiparabile (BoNT/A) o superiore (BoNT/B, C, D, E ed F) alla prova biologica su topo. Inoltre, si è verificata la specificità analitica del complesso anticorpo-tossina per il peptide designato.

Durante la sperimentazione su matrici complesse manualmente infettate è stato possibile applicare il metodo Endopep-MS a tutte le tossine, permettendone una tipizzazione specifica attraverso l'individuazione dei frammenti peptidici C-terminale (CT) e N-terminale (NT) ottenuti dall'attività enzimatica delle stesse, confermando i dati bibliografici raccolti (Kalb *et al.*, 2006; Drigo *et al.*, 2020). La tossina A è l'unica per cui si sono riscontrati dati non soddisfacenti in brodocolture ed ulteriori analisi hanno indicato che la causa potrebbe essere imputabile al pH delle soluzioni che potrebbe determinare modifiche a carico della struttura tridimensionale della BoNT/A di riferimento con una diminuzione dell'efficienza dell'attività e/o ad una perdita di titolo della tossina stessa. Sarà quindi opportuno in primis rivalutare il titolo del sierotipo A della tossina mediante prova biologica ed eventualmente eseguire nuovamente le prove di sensibilità considerando il nuovo titolo. Infine, la procedura di indagine diagnostica su matrici contaminate fornite dal Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo ha prodotto risultati molto promettenti per quanto concerne sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica che si attestano a valori superiori all'85% per tutte le tossine osservate (BoNT/A, B, E ed F). Al contempo i valori predittivi positivo e negativo risultano leggermente inferiori. La causa principale dell'ampio range di confidenza dei dati ottenuti è imputabile al basso numero di campioni positivi per ciascuna tossina analizzati ma tali parametri dovranno essere rivalutati dopo l'analisi di ulteriori campioni naturalmente contaminati che però non sono facilmente reperibili.

Le osservazioni raccolte, se confrontate con la procedura applicata precedentemente dall'IZSve di Treviso (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2016), mostrano che la nuova metodica registra un limite di rilevabilità minore su campioni in soluzione e in

siero infettati da BoNT/C, ma viceversa, la sensibilità risulta minore per la BoNT/A. Questo dato sembra sostenere l'ipotesi di una perdita di titolo della tossina A nel tempo, avendo utilizzato lo stesso lotto.

Possiamo quindi affermare la tecnica EndoPep-MS presenta notevoli vantaggi a livello logistico ed applicativo rispetto al *gold standard*, in particolare i dati sperimentali ottenuti dallo strumento MALDI *Biotyper sirius* sono risultati di rapida acquisizione, sufficientemente affidabili e con una sensibilità maggiore rispetto alla prova biologica in topo nella maggior parte dei casi.

La metodica descritta si inserisce in un contesto di validazione del metodo EndoPep, per cui l'analisi di matrici alimentari complesse è un passaggio fondamentale a sostegno degli esiti dei test precedenti (Drigo *et al.*, 2020; Kalb *et al.*, 2015).

Considerando i tempi di incubazione previsti per le differenti tossine si osserva che per BoNT/C e BoNT/D sono maggiori rispetto alle altre neurotossine botuliniche ma rimane una metodica notevolmente vantaggiosa rispetto al *gold standard*.

L'unico svantaggio dell'attuale tecnica EndoPep-MS è imputabile alla mancanza di anticorpi commerciali utilizzabili a scopo diagnostico.

Gli obiettivi futuri riguarderanno la produzione e la validazione di anticorpi commerciali idonei ad analisi diagnostiche, con elevata specificità per la tossina e il peptide designato e in ultima analisi risulta essenziale calcolare specificità, sensibilità, accuratezza e valori predittivi positivo e negativo con un maggior numero di campioni positivi, preferibilmente naturalmente infetti.

In conclusione, le prove effettuate dimostrano che la metodica EndoPep-MS, sviluppata inizialmente in spettrometri di massa maggiormente performanti, è applicabile allo strumento MALDI *Biotyper sirius* con ottimi risultati e che tale procedura potrà essere facilmente eseguibile in un laboratorio di microbiologia clinica senza la necessità di personale altamente qualificato. Pertanto, in futuro la tecnica potrebbe soppiantare la maggior parte delle analisi effettuate su topo per quanto riguarda la tossina botulinica e attualmente risulta altrettanto promettente per tossine con un meccanismo di attivazione simile, come la tossina tetanica.

Bibliografia:

- Brunt, J. *et al.*, 2016. Diversity of the Germination Apparatus in *Clostridium botulinum* Groups I, II, III, and IV. *Front Microbiol* (7:1702).
- Cai, S., Kumar, R. & Singh, B., 2021. Clostridial Neurotoxins: Structure, Function and Implications to Other Bacterial Toxins. *Microorganisms*.
- Cardoso, J., Pereira, L., Iversen, M. & Ramos, A., 2014. What is gold standard and what is ground truth? *Dental Press J Orthod*.
- Dressler, D., Saberi, F. & Barbosa, E., 2022. Botulinum toxin: mechanisms of action. [Online] Available at: <https://www.scielo.br/j/anp/a/W8GxPmf8mkb7cz4tXb3bWMt/?lang=en>
- Drigo, I. *et al.*, 2020. Detection of Active BoNT/C and D by EndoPep-MS Using MALDI Biotyper Instrument and Comparison with the Mouse Test Bioassay. *Toxins (Basel)*.
- Fach, P. *et al.*, 2009. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. *Applied Microbiology International*, Volume Volume107, Issue2, pp. 465-473.
- Galli, C., Corsini, E. & Marinovich, M., 2016. TOSSICOLOGIA. 3° edizione a cura di Padova: Piccin Nuova Libreria.
- Grenga, L., Pible, O. & Armengaud, J., 2019. Pathogen proteotyping: A rapidly developing application of mass spectrometry to address clinical concerns.. *Clin Mass Spectrom.*, 29 Apr.
- Hatheway, C., 1990. Toxigenic clostridia. *Clin Microbiol Rev*.
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2016. Sviluppo di un metodo basato sulla spettrometria di massa per la rilevazione delle neurotossine botuliniche, s.l.: s.n.
- Kalb, S., Baudys, J., Wang, D. & Barr, J., 2015. Recommended mass spectrometry-based strategies to identify botulinum neurotoxin-containing samples. *Toxins*, pp. 1765-78.
- Kalb, S. *et al.*, 2015. Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods by Endopep-MS. *J Agric Food Chem*.
- Kalb, S. *et al.*, 2006. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal Biochem*, pp. 84-92.
- Kalia, V. *et al.*, 2011. Analysis of the unexplored features of rrs (16S rDNA) of the Genus *Clostridium*. *Genomica BMC*.
- Mansfield, M., Adams, J. & Doxey, A., 2015. Botulinum Neurotoxin Homologs in Non-Clostridium Species. Volume 589 (Numero 3), p. 342–348.
- Martínez-Carranza, M. *et al.*, 2023. Structure and activity of botulinum neurotoxin X. 11 Jan.
- Masuyer, G. *et al.*, 2018. Structural characterisation of the catalytic domain of botulinum neurotoxin X - high activity and unique substrate specificity. 14 Mar.
- Peck, M., Stringer, S. & Carter, A., 2011. *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. In: *Food Microbiology*. s.l.:Elsevier, pp. 183-191.

- Perry, M. *et al.*, 2017. Implementing the Bruker MALDI Biotyper in the Public Health Laboratory for *C. botulinum* Neurotoxin Detection. *Toxins*, 9 mar.
- Pirazzini, D. & Tehran, M., 2018. Novel Botulinum Neurotoxins: Exploring Underneath the Iceberg Tip. *10(190)*.
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R. & Montecucco, C., 2017. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol Rev*, Volume Vol. 69, Issue 2.
- Ramakrishnan, M., 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*, 12 May.
- Reed L.J. & Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The american journal of hygiene, may*. Vol. 27 (N°3).
- Ruge, D. *et al.*, 2011. Detection of six serotypes of botulinum neurotoxin using fluorogenic reporters. *Analytical Biochemistry*, 15 april, Volume Volume 411, pp. 200-209.
- Sakaguchi, Y. *et al.*, 2020. Analysis of a plasmid encoding botulinum neurotoxin type G gene in *Clostridium argentinense*. *Anaerobe* 66.
- Sebahia, M. *et al.*, 2007. Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. *Genome Research*.
- Simpson, L., 1992. Botulinum neurotoxin and tetanus toxin. In: *Botulinum neurotoxin and tetanus toxin*. s.l.: Academic Press, Inc.
- Smith, T. *et al.*, 2015. Genomic sequences of six botulinum neurotoxin-producing strains representing three clostridial species illustrate the mobility and diversity of botulinum neurotoxin genes. *Infection, Genetics and Evolution*, Volume Volume 30, pp. Pages 102-113.
- Smith, T. *et al.*, 2005. Sequence Variation within Botulinum Neurotoxin Serotypes Impacts Antibody Binding and Neutralization. *Infection and Immunity*, Volume Vol. 73 n°9.
- Talukdar, P., Olgún-Araneda, V., Alnoman, M. & D. Paredes-Sabja, M. S., 2015. Updates on the sporulation process in *Clostridium* species. *Research in Microbiology*, Volume Volume 166, Issue 4, pp. Pages 225-235.
- Viviani, B., 2016. Tossine che agiscono come metalloproteasi. In: *Tossicologia*. 3° edizione a cura di Padova: Piccin Nuova Libreria, p. Page 392.
- Weigand, M. *et al.*, 2015. Implications of Genome-Based Discrimination between *Clostridium Botulinum* Group I and *Clostridium Sporogenes* Strains for Bacterial Taxonomy.. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 81 (n° 16).
- Wentz, T. *et al.*, 2017. Closed Genome Sequence of *Chryseobacterium piperi* Strain CTMT/ATCC BAA-1782, a Gram-Negative Bacterium with Clostridial Neurotoxin-Like Coding Sequences. *Genome Announcement*.
- Zhang, S. *et al.*, 2018. Identification of a Botulinum Neurotoxin-Like Toxin in a Commensal Strain of *Enterococcus Faecium*.. *cell-host-microbe*, Vol. 23 (n°2), pp. Pages 169-176.

Sitografia:

- [1] Anibaldi, F., s.d. Botulismo alimentare. [Online] Available at: <https://www.epicentro.iss.it/botulismo/> [Consultato il giorno 16/11/2022].
- [2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, s.d. Botulismo. [Online] Available at: <https://www.izsvenezie.it/temi/malattie-patogeni/botulismo/> [Consultato il giorno 16/11/2022].
- [3] Istituto Superiore di Sanità, 2019. Botulismo. [Online] Available at: [https://www.iss.it/focus/-/asset_publisher/92GBB5m5b1hB/content/botulismo#:~:text=I%20numeri%20e%20la%20patologia,per%20il%20Botulismo%20\(CNRB\)](https://www.iss.it/focus/-/asset_publisher/92GBB5m5b1hB/content/botulismo#:~:text=I%20numeri%20e%20la%20patologia,per%20il%20Botulismo%20(CNRB)) [Consultato il giorno 16/11/2022].
- [4] Istituto Superiore di Sanità, 2022. Alimentazione, nutrizione e sicurezza degli alimenti. [Online] Available at: https://www.iss.it/alimentazione-nutrizione-sicurezza-alimenti/-/asset_publisher/I5M6X036FZD6/content/metodi-di-analisi [Consultato il giorno 22/11/2022].
- [5] Istituto Superiore di Sanità, s.d. Focus - Botulismo - Botulismo alimentare. [Online] Available at: [https://www.iss.it/focus/-/asset_publisher/92GBB5m5b1hB/content/botulismo#:~:text=I%20numeri%20e%20la%20patologia,per%20il%20Botulismo%20\(CNRB\)](https://www.iss.it/focus/-/asset_publisher/92GBB5m5b1hB/content/botulismo#:~:text=I%20numeri%20e%20la%20patologia,per%20il%20Botulismo%20(CNRB)) [Consultato il giorno 16/11/2022].
- [6] Food and Drugs Administration, 2014. Water Activity (aw) in Foods. [Online] Available at: <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/water-activity-aw-foods> [Consultato il giorno 23/11/2022].
- [7] Immagine created with www.biorender.com
- [8] Istituto Superiore di Sanità, 2021. Centro nazionale di riferimento per il botulismo. [Online] Available at: <https://www.iss.it/cnr-b-il-centro-nazionale-di-riferimento> [Consultato il giorno 22/11/2022].
- [9] Dipartimento sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria, s.d. ISS-SPVA N RL CNRB 30.013- Rev3 - Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche e per la ricerca di tossine botuliniche (metodo colturale e mouse test). [Online] Available at: <https://www.iss.it/documents/20126/8159535/Metodo+CNRB30.013.pdf/6481393f-dfbd-2dfc-fda1-7d814ee0c74d?t=1674468668175>
- [10] Dipartimento sicurezza alimentare, nutrizione e sanità pubblica veterinaria, s.d. ISS-SPVA N RL CNRB 31.013-Rev 3 - Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR, s.l.: s.n.
- [11] Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2010. Direttiva 2010/63/ue del parlamento europeo e del consiglio. [Online] Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=EN>
- [12] Certificati di analisi delle tossine A, B, C, D, E ed F sia dei lotti 2013-2014 e del 2022, Metabiologics Inc.
- [13] Certificati di analisi dei peptidi 21, B, C, D/F ed E anno 2013 – 2015 GenScript, JPT e CRIBI
- [14] MedCalc Software Ltd, s.d. Medcalc. [Online] Available at: https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php [Consultato nel 2023].

Ringraziamenti:

Vorrei ringraziare tutte le persone che mi hanno accompagnata in questi anni, per essere stati tutti un sostegno importante e decisivo nella mia formazione.

In particolare, vorrei ringraziare la Professoressa Barbara Cardazzo che mi ha seguita e supportata nella stesura della tesi, ma soprattutto la ringrazio per essere sempre stata disponibile e per avermi permesso di lavorare a questo progetto valorizzando i miei interessi.

Ringrazio la sezione di Treviso dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie per avermi accolta e in particolare le Dottoresse Ilenia Drigo ed Elena Tonon per avermi guidata e formata, permettendomi di sperimentare in autonomia l'attività laboratoriale.

Vorrei ringraziare la mia famiglia per tutto l'aiuto e il supporto, senza cui non sarei mai arrivata a questo punto. A mia mamma Cristina grazie per avermi sempre spronata a dare meglio di me durante questi anni universitari, a Fabio che non ha mai perso un'occasione per ricordarmi quanto sia fiero di me, ad Alice che con la sua allegria e positività mi ha sempre rassicurata e a Silvia che mi ha sempre raccolta nei momenti di difficoltà aiutandomi a ritrovare la mia autostima e serenità.

Sono grata ai miei nonni, Clara e Albano, per non aver mai dimenticato una data d'esame, per essere sempre stati interessati e orgogliosi del mio percorso.

Concludo ringraziando Marco, il miglior "compagno" di studio che potessi scegliere, grazie per avermi supportata e sopportata tutte le volte che pensavo di non farcela.