

IMPIEGO DELL'ENDOPEP-MS PER LA DIAGNOSI DEL BOTULISMO AVIARE: RISULTATI PRELIMINARI

Drigo I., Pascoletti S., Tonon E., Puiatti C., Bano L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di batteriologia speciale SCT2- Treviso. Vicolo Mazzini 4, 31020 Fontane di Villorba (TV)

Summary

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are the most poisonous substances known and for this reason, they are considered a possible bioterrorism weapon. Avian botulism is sustained mainly by Type C botulinum neurotoxin (BoNT/C). The reference method for BoNTs detection and identification, both in food and clinical samples, is the mouse bioassay. This method is sensitive, specific and is able to measure also toxin activity but it is time consuming and requires the use of many animals that represent an important ethical issue. Mass spectrometry has become an important analytical tool for many applications in microbiology, including bacteria identification. Recently a method for toxin detection and serotype differentiation based on LC-ESI-MS/MS and MALDI-TOF MS (EndoPep-MS method), coupled with antibody purification and enrichment of toxins, it has been developed and successfully applied on sera and feces for detection of A, B, E and F toxins and promising results were obtained also for toxin C and D.

The specific objective of this work is to set up and validate a mass spectrometry method for detection of BoNT/C in animal origin samples using the MALDI-Biotyper instrument (Bruker Daltonics). The EndoPep-MS showed to be efficiently applicable to MALDI-Biotyper instrument. The sensitivity of the method applied on naturally contaminated samples (sera and faeces) showed a sensitivity higher than the mouse test, considered the gold test for the BoNTs detection. Moreover, the EndoPep-MS allow reducing the time of response, the cost of analysis and, above all, it showed to be a reliable and ethically tenable replacement of the use of animals for the diagnosis of botulism.

INTRODUZIONE

Le neurotossine botuliniche (BoNT) sono tra le sostanze biologiche più tossiche conosciute e per questo motivo sono anche considerate una possibile arma bioterroristica (1). Le BoNT sono prodotte da alcuni batteri del genere *Clostridium* in particolare *C. botulinum*, *C. baratii*, *C. butyricum* e *C. argentinense* e sono suddivise in sette sierotipi, da A a G, in base alla loro attività antigenica. I casi di botulismo animale sono da ricondurre prevalentemente ai sierotipi C e D o a tossine definite "mosaico" in quanto presentano antigeni riferibili sia al tipo "D" che al tipo "C". Queste ultime forme si definiscono C/D quando i determinanti antigenici del tipo C prevalgono su quelli del tipo D, oppure D/C in caso contrario (5). Attualmente il gold test per la conferma dei casi di botulismo è rappresentato dalla prova biologica su topo: si tratta di un saggio di letalità che risulta essere molto sensibile (LoD stimata per la tossina A pari a 1 mDL₅₀ topo) ed in grado di valutare contemporaneamente la presenza di tossine biologicamente attive e, mediante l'utilizzo di antisieri specifici, anche di definire il sierotipo della tossina coinvolta. Tuttavia, il *mouse bioassay* richiede il sacrificio di numerosi animali e almeno 4 giorni di tempo per la conferma dei campioni negativi (8). Molti sforzi sono stati fatti negli ultimi anni con l'intento di sviluppare metodi alternativi alla prova di letalità su topo ma con

scarsi risultati. Recentemente un gruppo di ricerca del Centers for Disease and Control di Atlanta (USA) ha messo a punto un metodo basato sulla tecnologia MALDI-TOF per la rilevazione e la differenziazione in sierotipi delle tossine botuliniche più frequentemente coinvolte in episodi di malattia dell'uomo. Questo metodo, denominato Endopep-MS, permette d'individuare la presenza ed il sierotipo di BoNTs attive, attraverso la rilevazione dei prodotti di clivaggio di peptidi sintetici che mimano i naturali substrati di queste tossine ad attività metallo-proteasica. L'EndoPep-MS è stato applicato con successo su campioni di siero e feci per la rilevazione delle tossine A, B, E ed F e promettenti risultati sono stati ottenuti anche con le tossine C e D (2, 3, 6, 7). Lo sviluppo di metodi basati sulla tecnologia MALDI-TOF MS per l'identificazione batterica hanno avuto un rapido sviluppo negli ultimi anni e questa rapida diffusione in un numero crescente di laboratori diagnostici è dovuta alla sua versatilità, rapidità di analisi, alla riduzione dei costi dei materiali di consumo ed alla possibilità di testare un numero elevato di campioni in poco tempo. Il principale obiettivo di questo lavoro è quello di mettere a punto e validare un test Endopep-MS che permetta di rilevare e caratterizzare rapidamente la presenza delle BoNT di tipo C in campioni clinici utilizzando lo strumento MALDI Biotyper (Bruker Daltonics).

MATERIALI E METODI

Campionamento

I campioni biologici sottoposti all'analisi sono stati raccolti nel corso di 11 focolai di botulismo aviario osservati tra il 2009 e il 2015. Questi erano costituiti da 18 sieri (12 polli, 1 tacchino, 2 fagiani, 2 germani reali, 1 anatra domestica) prelevati da soggetti sintomatici, e da un campione di contenuto intestinale di un cigno deceduto dopo una sintomatologia caratterizzata da paralisi flaccida della muscolatura del collo e delle ali. Nell'indagine è stato incluso anche il siero di un cane da caccia sintomatico che aveva ingerito parte di una carcassa di un uccello selvatico rinvenuta durante una battuta di caccia. Tutti i campioni sono stati testati mediante il metodo EndoPep-MS messo a punto come riportato di seguito.

EndoPep-MS

500 µl di siero o 500 µl di contenuto intestinale diluito 1:1 in tampone fosfato gelatina sono stati addizionati di 20 µl di biglie coattate con gli anticorpi 8DC1.2 (legame con sierotipi C, C/D, D e D/C, University of California) e 4C2 (legame con sierotipi C e D/C, University of California) in proporzione 1:1 e successivamente incubati per un'ora a temperatura ambiente in agitazione mediante agitatore orbitale a velocità fissa. Le biglie sono state quindi catturate con l'ausilio di un supporto magnetico, il surnatante è stato scartato e le biglie sono state lavate per due volte con 1ml di PBST (Sigma Aldrich), una volta con 150µl di PBST ed infine con 80µl di acqua ultrapura (Sigma-Aldrich). Dopo aver rimosso tutta l'acqua, le biglie sono state risospese in 18µl di Reaction Buffer (10 mM Hepes buffer, 0,2 mM ZnCl₂, 1 mg/ml BSA, 0,1 M DTT) e 2µl del peptide Pep-C (4). I campioni sono stati infine incubati in termociclatore a 37 °C over night. Al termine dell'incubazione 1 µl di ciascun surnatante è stato trasferito nell'apposito supporto per campioni dello strumento MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) ed è stato addizionato di 1µl di matrice costituita da una soluzione sovrasatura di acido α-ciano idrossi cinamminico (HCCA, Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando lo strumento Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics) ed il software FlexControl versione

3.3 (Bruker Daltonics) con un range di lettura da 720 a 5000 m/z . Ciascuno spettro è stato acquisito in positive linear mode con una frequenza del laser di 30 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. In tabella 1 sono riportati i risultati attesi per la combinazione tossina C/peptide.

Tossina + peptide	m/z		
BoNT-C + Pep-C	2912.3	$[M+H]^+$	Assenza di tossina C
	1457.1	$[M+2H]^{2+}$	
	1059.5	CT	Presenza di tossina C
	1870.9	NT	

Tabella 1. Risultati attesi dall'analisi con il MALDI-TOF. NT= frammento N terminale, CT= frammento C terminale, $[M+H]^+$ = massa attesa peptide integro monoprotonato, $[M+2H]^{2+}$ =massa attesa peptide integro diprotonato .

RISULTATI E DISCUSSIONE

In tabella 2 sono messi a confronto i risultati del *mouse bioassay* e dell'EndoPep-MS ottenuti per i 19 campioni di siero e il campione di contenuto intestinale.

Campione	Specie	Matrice	Mouse Bioassay	EndoPep- MS BoNT/C
5674/10	Anatra domestica	Siero	Tipo C	Positivo
8103/2/09	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
8103/10/09	Pollo	Siero	Negativo	Positivo
8103/13/09	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
2659/2/10	Pollo	Siero	Negativo	Negativo
2659/4/10	Pollo	Siero	Negativo	Positivo
2659/5/10	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
4691/11	Tacchino	Siero	Tipo C	Positivo
4863/13	Fagiano	Siero	Tipo C	Positivo
474/14	Cane	Siero	Tipo C	Positivo
5313/28/14	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
5313/29/14	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
5313/30/14	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
6289/3/14	Germano reale	Siero	Negativo	Negativo
6289/4/14	Germano reale	Siero	Negativo	Negativo
5993/15	Fagiano	Siero	Tipo C	Positivo
6353/15	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
6660/1/15	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
6660/2/15	Pollo	Siero	Tipo C	Positivo
5641/12	Cigno	Contenuto intestinale	Tipo C	Positivo

Tabella 2. Risultati del *mouse bioassay* e dell'EndoPep-MS ottenuti sui 20 campioni analizzati.

Come si può osservare in tabella 2, i campioni 8103/10 e 2659/4/10 risultati negativi alla prova biologica su topino sono invece risultati positivi all'EndoPep-MS. Entrambi erano stati prelevati da soggetti appartenenti ad un focolaio di botulismo confermato con la prova biologica eseguita su siero di altri soggetti. La positività riscontrata con L'EndoPep era chiara ma flebile ed è quindi plausibile che la non corrispondenza degli esiti sia dovuta alla presenza nel campione di una quantità di tossina al di sotto del limite di rilevabilità della prova biologica. Dalle prove effettuate finora l'EndoPep-MS sembrerebbe quindi più sensibile della prova biologica considerata il gold test per la diagnosi di botulismo.

CONCLUSIONI

Le prove preliminari effettuate su campioni di siero e feci naturalmente contaminati ha permesso di verificare che il metodo EndoPep-MS per la rilevazione della tossina botulinica di tipo C è efficacemente applicabile allo strumento Bruker MALDI-biotyper che è sempre più diffuso nei laboratori di diagnostica clinica sia veterinari che umani per l'identificazione routinaria dei microorganismi. Oltre a concorrere alla corretta identificazione batterica lo strumento potrebbe trovare impiego anche per la rilevazione di importanti fattori di virulenza batterici, quali la neurotossina botulinica. Infatti, dalle prove finora eseguite, il metodo è risultato addirittura più sensibile rispetto al gold test per la diagnosi di botulismo, rappresentato dalla prova biologica su topino.

La sostituzione del *mouse test* con questo metodo in spettrometria di massa permetterebbe:

- una riduzione dei tempi di risposta (il tempo di risposta per il *mouse test* è infatti di 4 giorni mentre per l'EndoPep-MS sono sufficienti solamente 18 ore);
- una riduzione del costo dell'analisi;
- e soprattutto la sostituzione di animali da laboratorio utilizzati per la diagnosi di botulismo, pur garantendo una pari o addirittura migliore sensibilità.

I risultati del presente studio sono stati ottenuti nell'ambito della Ricerca Corrente RC IZS VE 05/12 intitolata "sviluppo di un metodo basato sulla spettrometria di massa per la rilevazione delle neurotossine botuliniche", finanziata dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

1. Arnon, S. S., R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat, and Working Group on Civilian Biodefense (2001). Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 285:1059-1070.
2. Boyer, A. E., M. Gallegos-Candela, R. C. Lins, Z. Kuklennyik, A. Woolfitt, H. Moura, S. Kalb, C. P. Quinn, and J. R. Barr (2011). Quantitative mass

spectrometry for bacterial protein toxins—a sensitive, specific, high-throughput tool for detection and diagnosis. *Molecules* 16:2391-2413.

3. Boyer, A. E., H. Moura, A. R. Woolfitt, S. R. Kalb, L. G. McWilliams, A. Pavlopoulos, J. G. Schmidt, D. L. Ashley, and J. R. Barr (2005). From the mouse to the mass spectrometer: detection and differentiation of the endoprotease activities of botulinum neurotoxins A-G by mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77:3916-3924.
4. Hedeland, M., H. Moura, V. Baverud, A. R. Woolfitt, U. Bondesson, and J. R. Barr (2011). Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS. *J. Med. Microbiol.* 60:1299-1305.
5. Hill, K. K., T. J. Smith, C. H. Helma, L. O. Ticknor, B. T. Foley, R. T. Svensson, J. L. Brown, E. A. Johnson, L. A. Smith, R. T. Okinaka, P. J. Jackson, and J. D. Marks (2007). Genetic diversity among Botulinum Neurotoxin-producing clostridial strains. *J. Bacteriol.* 189:818-832.
6. Kalb, S. R., J. C. Krilich, J. K. Dykes, C. Luquez, S. E. Maslanka, and J. R. Barr (2015). Detection of Botulinum Toxins A, B, E, and F in Foods by Endopep-MS. *J. Agric. Food Chem.*
7. Kalb, S. R., H. Moura, A. E. Boyer, L. G. McWilliams, J. L. Pirkle, and J. R. Barr (2006). The use of Endopep-MS for the detection of botulinum toxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal. Biochem.* 351:84-92.
8. Lindstrom, M., H. Korkeala (2006). Laboratory diagnostics of botulism. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:298-314.