



Laura Giovati

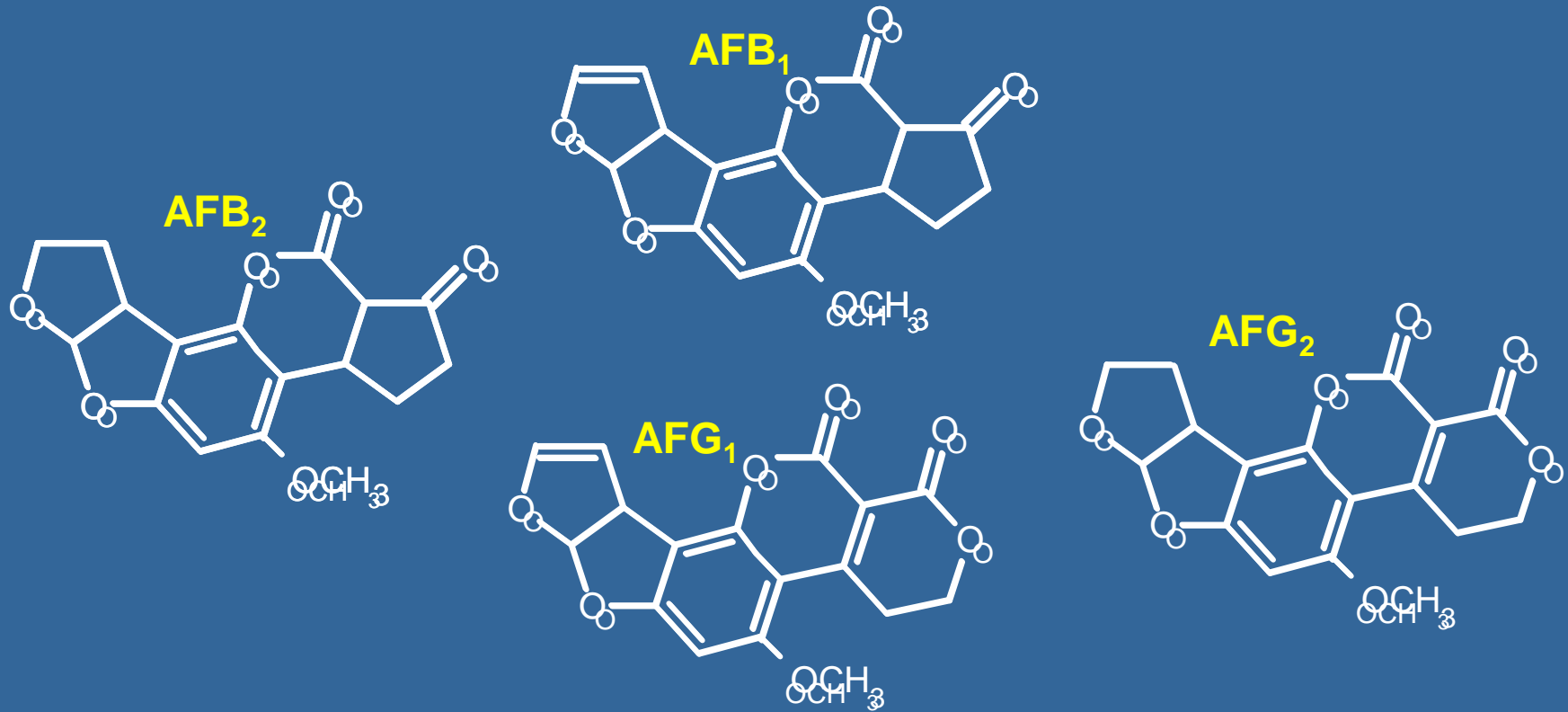
Unità di Microbiologia e Virologia
Dipartimento di Scienze Biomediche, Biotecnologiche e Traslazionali
Università degli Studi di Parma

Realizzazione di un vaccino bovino per la prevenzione del trasferimento di aflatossina B₁, sottoforma di aflatossina M₁, nel latte

**XI Congresso Nazionale FIMUA
Aci Castello, Catania
15 – 17 novembre 2012**



Aflatossine

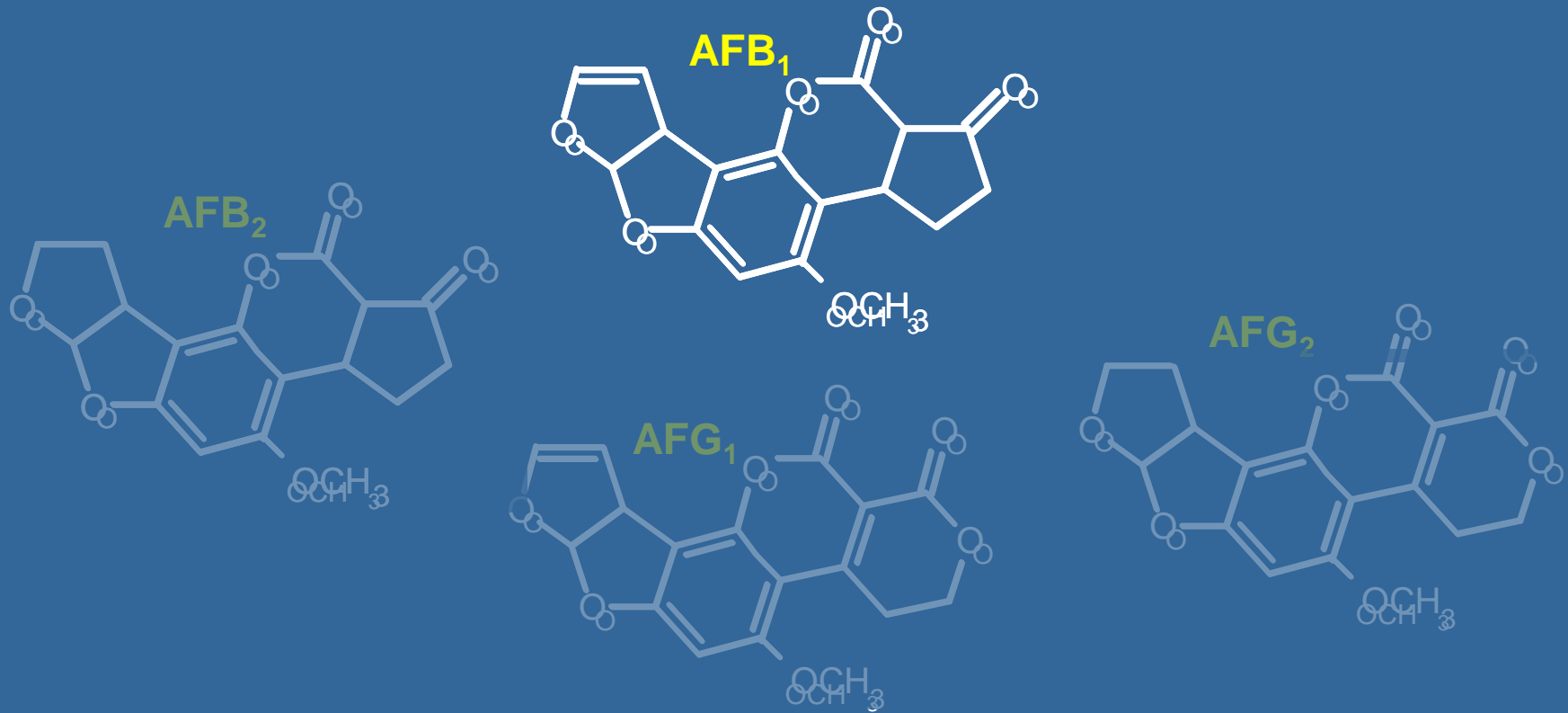


Le Aflatossine (AF), prodotte principalmente da alcuni ceppi di *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, sono tra le più importanti micotossine di interesse medico (tossiche, mutagene, teratogene, immunomodulanti, cancerogene)

Le AF più frequentemente riscontrate negli alimenti di origine vegetale sono distinte in B₁, B₂, G₁, G₂



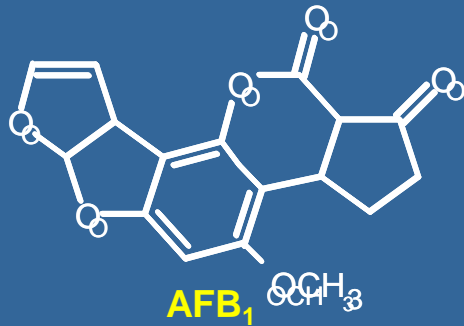
Aflatoossine



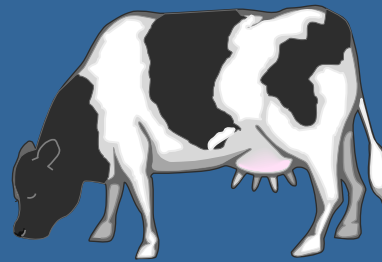
AFB₁ è la forma prevalente e più tossica
AFB₁ è il più potente composto cancerogeno naturale conosciuto



Trasferimento di AFB₁ sottoforma di AFM₁ nel latte



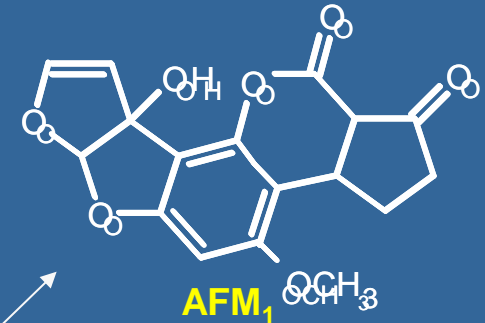
Mangime contaminato



Vacca in lattazione



Fegato



Latte

Nei mammiferi, in seguito a biotrasformazione epatica, AFB₁ può essere trasferita da mangime contaminato al latte sottoforma di AFM₁

AFM₁ presenta la stessa tossicità di AFB₁ ed è potenzialmente cancerogena



Metodi attualmente utilizzati per ridurre il trasferimento di AFB₁ nel latte

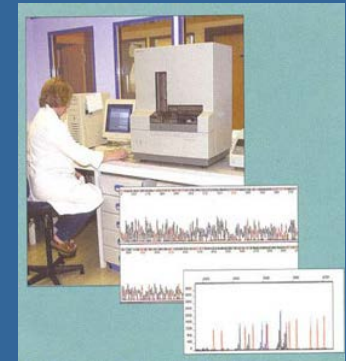


Prevenzione della contaminazione in campo e durante le fasi di raccolta e stoccaggio



Limiti per i livelli di AFB₁ nei mangimi (UE 5 µg/kg) e di AFB₁ nel latte (UE 50 ng/kg)

Monitoraggio del contenuto di AF



Inclusione di agenti sequestranti

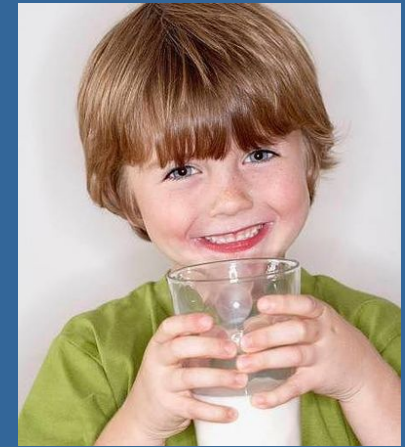
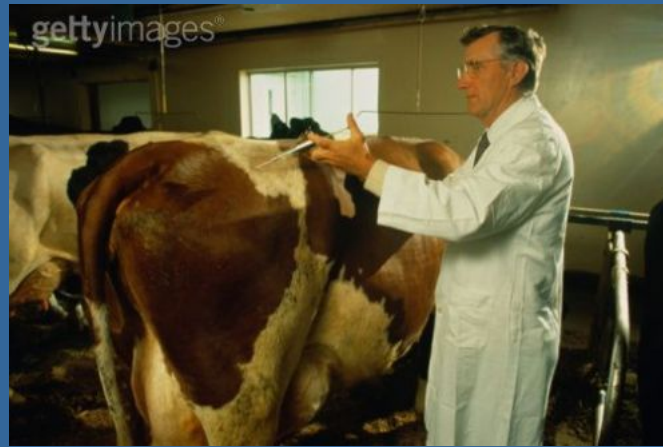
(aluminosilicati, bentoniti, zeoliti, carboni attivi, argille) nei mangimi contaminati per ridurre la biodisponibilità di AF durante le fasi digestive

Riduzioni del 20-50%

Phillips, T. D. et al. 2008. Food Addit Contam 25:134



Strategia vaccinale per la protezione da aflatossicosi M_1 nell'uomo



Ideazione e sviluppo di un vaccino bovino per la prevenzione del trasferimento di AFB_1 sottoforma di AFM_1 nel latte di vacche intossicate



Strategia vaccinale per la protezione da aflatossicosi M_1 nell'uomo



Problematiche

Le AF sono apteni, molecole in grado di agire come antigeni ma non come immunogeni

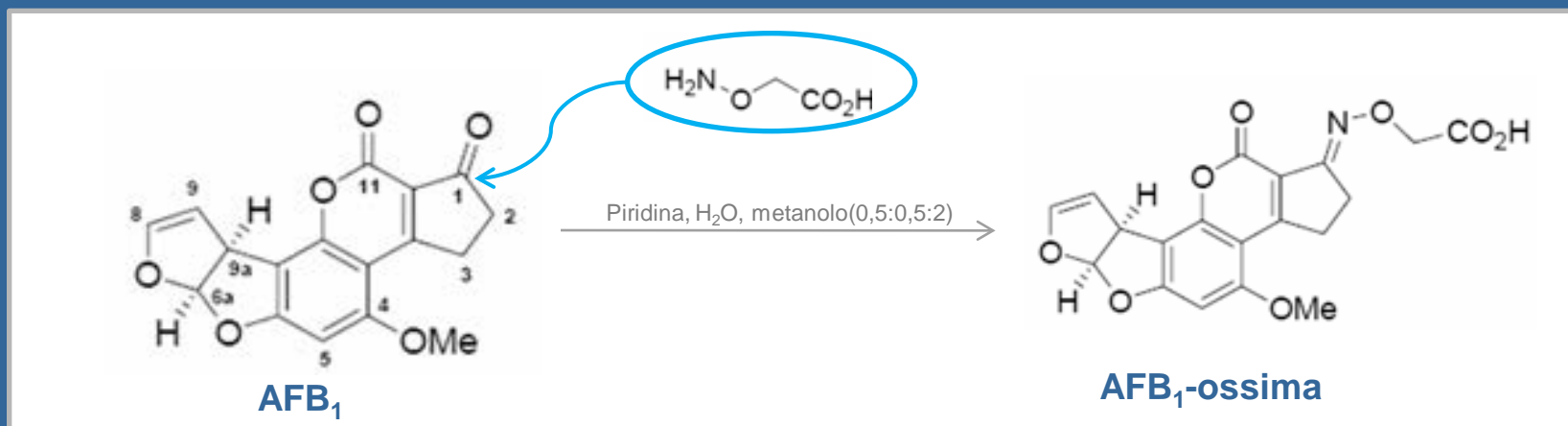
AFB₁ non presenta gruppi funzionali alla coniugazione a proteine carrier

Le caratteristiche di tossicità di AFB₁ ne limitano l'utilizzo in coniugati proteici da utilizzare come vaccino



Modificazione chimica di AFB₁ e valutazione delle proprietà tossiche e mutagene del prodotto *in vitro*

Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777



Introduzione di un gruppo carbossilico in posizione 1 di AFB₁ mediante reazione con H₂N-O-CH₂-COOH, risultante in AFB₁-ossima

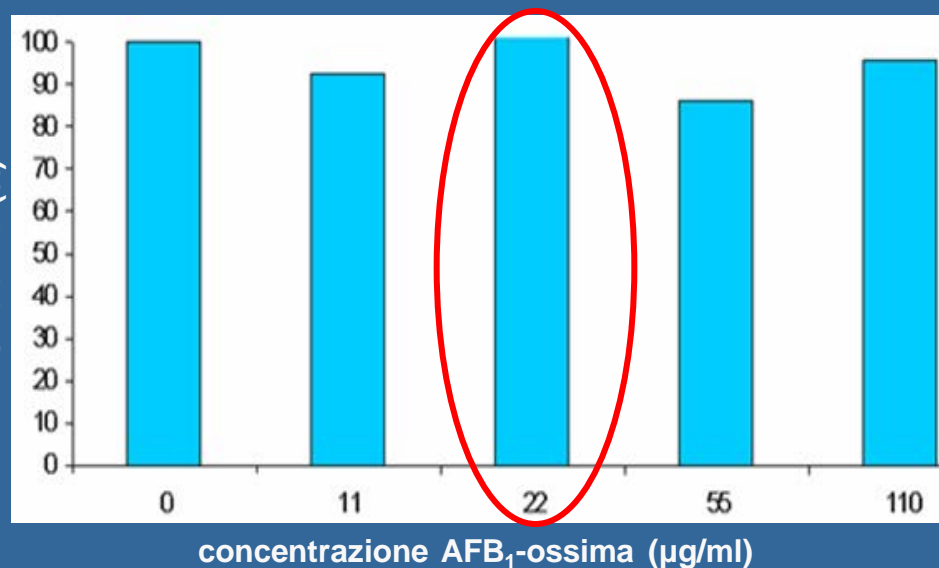
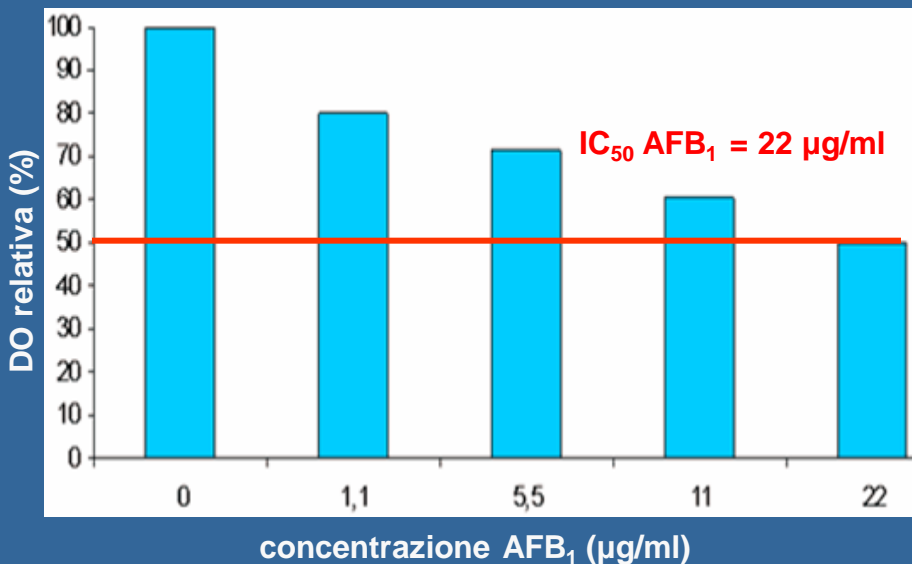
Valutazione della
citotossicità
in cellule di
epatocarcinoma umano
(HepG2)

Valutazione della
mutagenicità
in cellule di
Salmonella
typhimurium



Tossicità differenziale di AFB₁ e AFB₁-ossima nei confronti di cellule di epatocarcinoma umano

Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777



La proliferazione delle cellule (HepG2) è rappresentata come DO relativa, determinata mediante saggio con AlamarBlue, calcolata come rapporto percentuale rispetto al valore di DO letto a 570 nm per cellule non esposte ad AFB₁ o ad AFB₁-ossima. La concentrazione di AFB₁ in grado di determinare una inibizione del 50% della proliferazione cellulare è stata definita IC₅₀.

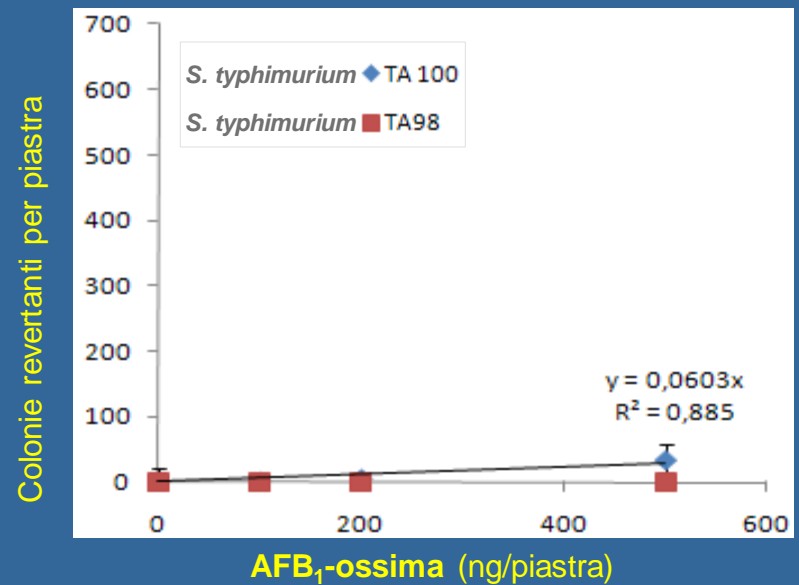
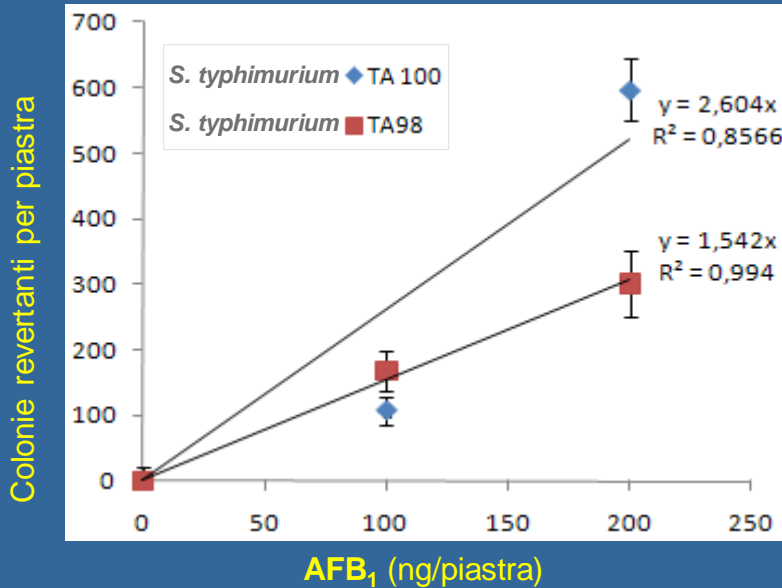
AFB₁ ha mostrato una tossicità dose dipendente nei confronti di cellule HepG2

Non sono stati riscontrati effetti tossici significativi per concentrazioni di AFB₁-ossima fino a 5 volte la IC₅₀ determinata per AFB₁



Mutagenicità differenziale di AFB₁ e AFB₁-ossima nei confronti di *Salmonella typhimurium*

Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777



La mutagenicità è stata valutata, mediante test di Ames, come coefficiente angolare della retta di regressione costruita riportando il numero dei revertanti in funzione dei ng di campione incorporati in piastra. I punti in grafico rappresentano la media \pm DS di tre piastre replicate. Il numero di revertanti spontanei di 6 ± 2 e 25 ± 22 , ottenuto rispettivamente per *S. typhimurium* TA 98 e TA 100, è stato sottratto prima del calcolo della curva dose-risposta.

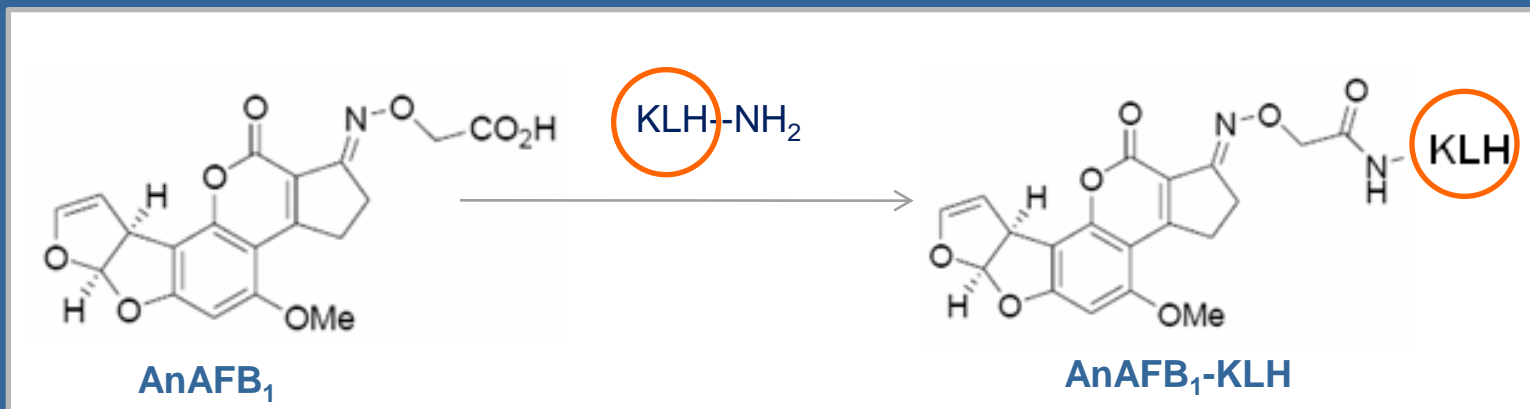
Il potere mutageno relativo di AFB₁-ossima (rapporto percentuale tra il coefficiente angolare calcolato per AFB₁-ossima e AFB₁) è risultato essere 2,3% in *S. typhimurium* TA 100 e 0% in *S. typhimurium* TA 98



Coniugazione di AnAFB₁ a KLH ed immunizzazione di vacche

Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777

Reazione dell'acido carbossilico con i gruppi amminici primari presenti sulla proteina KLH (emocianina di *Megathura crenulata*)



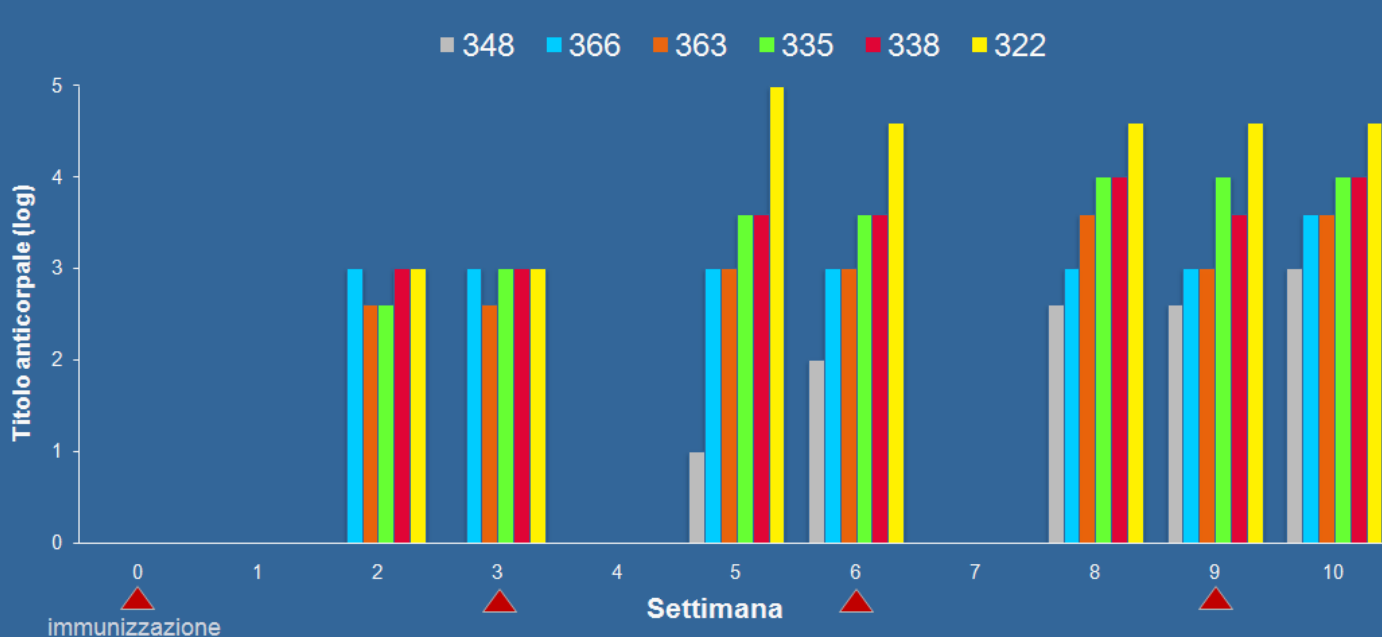
**Immunizzazione intramuscolo
di 6 vacche in fase di lattazione**

4 dosi da 500 µg intramuscolo
in adiuvante di Freund completo (1^a dose) e incompleto
(3 dosi successive)



Variazione nel tempo del titolo di Ab specifici per AFB₁ in vacche immunizzate con AnAFB₁-KLH

Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777



Valutazione di Ab specifici per AFB₁ mediante saggi immunoenzimatici di diluizioni successive dei sieri nei confronti del coniugato eterologo AFB₁-BSA

Definizione di titolo anticorpale: la maggiore diluizione di siero in grado di determinare una lettura di OD₄₅₀ più alta di 0,1 U rispetto alla lettura del siero pre-immune alla stessa diluizione

La titolazione di Ab specifici rilevabili alla 10^a settimana ha permesso la caratterizzazione sierologica della vacche in:

gruppo “**high-responder**” n. 322, n. 335, n.338 (titolo anticorpale :10.000 - 40.000)

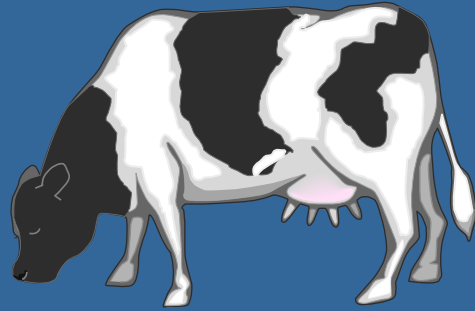
gruppo “**low-responder**” n. 348, n. 363, n.366 (titolo anticorpale : 1.000 - 4.000)

Nessuna delle vacche immunizzate è risultata positiva al test della tubercolina



Somministrazione di AFB₁ e quantificazione di AFM₁ escreta nel latte di vacche immunizzate

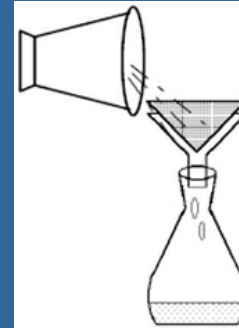
Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777



140 µg AFB₁/capo per 11 giorni

Prelievo di campioni di latte
(2 mungiture giornaliere)

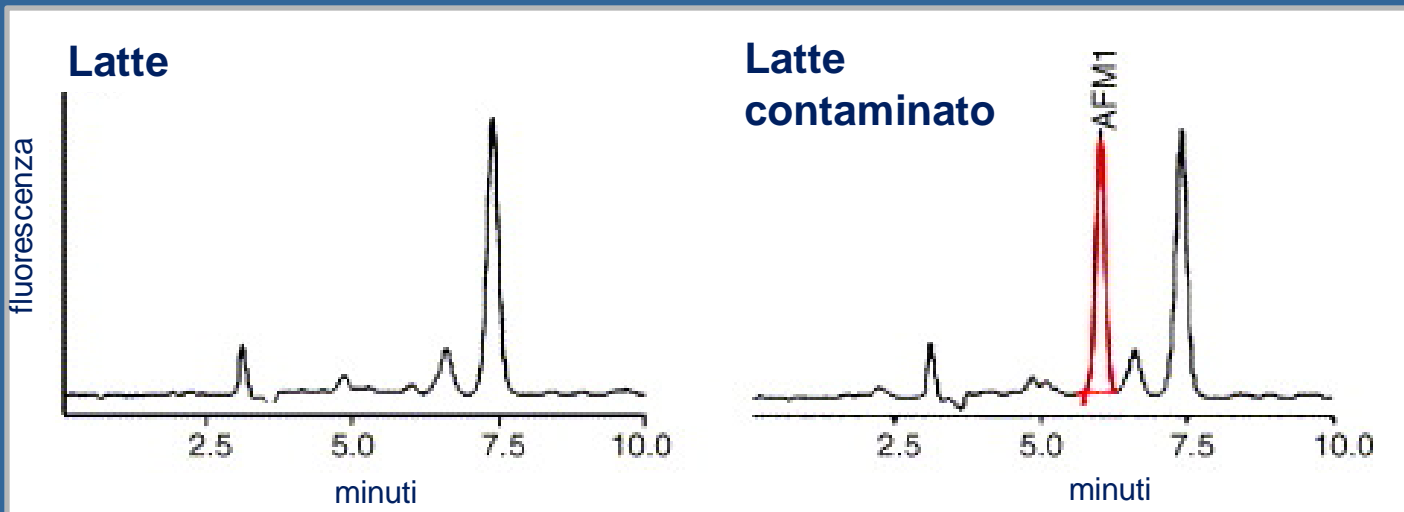
Scrematura
(4000 g 10')



Filtrazione

Estrazione
di AF
(immunoaffinità)

Analisi degli estratti mediante HPLC – fluorescenza

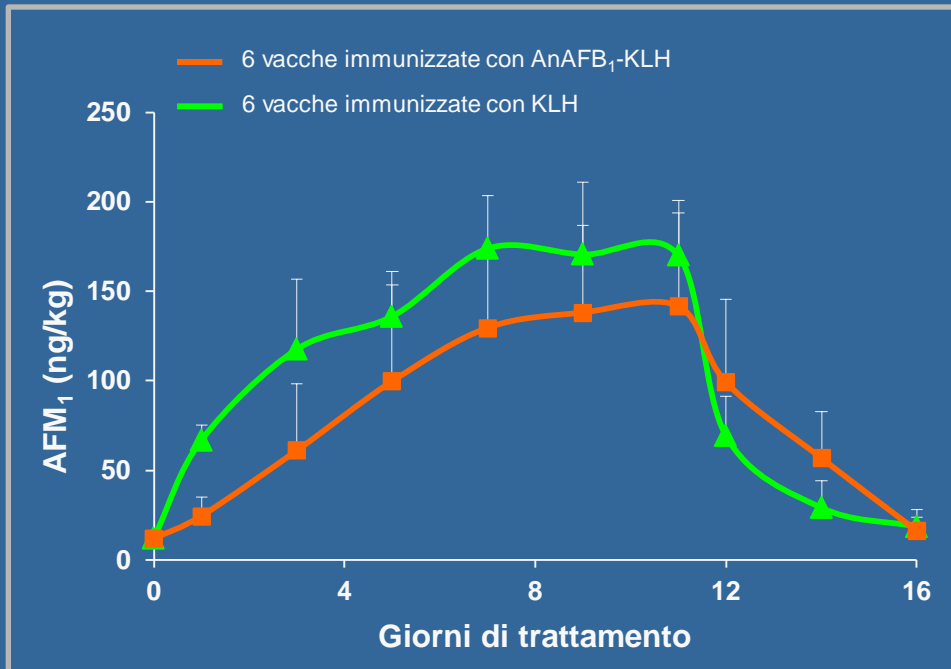


Determinazione della
concentrazione di AFM₁
mediante analisi
comparativa di
cromatogrammi di
soluzioni standard a
concentrazione nota



Quantificazione di AFM₁ escreta nel latte di vacche immunizzate in seguito a somministrazione di AFB₁

Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777



La concentrazione di AFM₁ escreta giornalmente a seguito di ingestione di quantità costanti di AFB₁ aumenta fino ad uno stato di plateau (stato stazionario di escrezione)

A causa di questo fenomeno, gli studi quantitativi di sul trasferimento di AFM₁ nel latte vengono condotti in seguito al raggiungimento del plateau

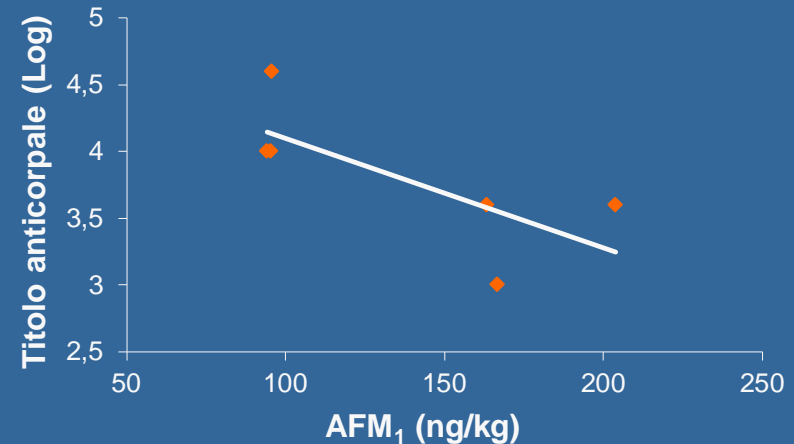
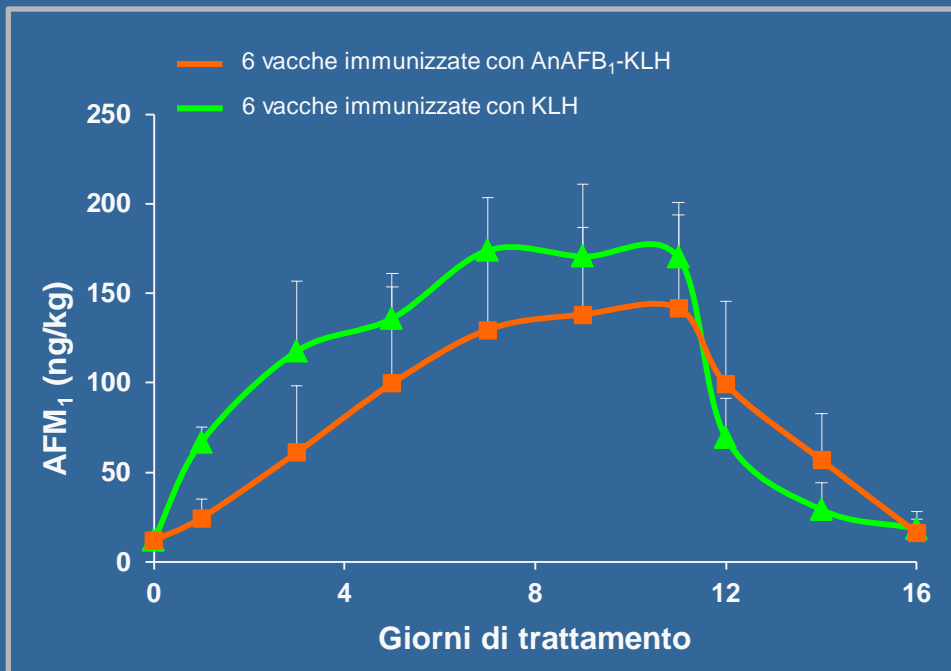
Veldman, A. et al. *Animal Production* 55:163

Considerando la totalità del latte prelevato nei cinque giorni di plateau è stato possibile determinare, negli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH, una riduzione media del 20% del quantitativo di AFM₁ escreta rispetto ai controlli



Quantificazione di AFM₁ escreta nel latte di vacche immunizzate in seguito a somministrazione di AFB₁

Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777



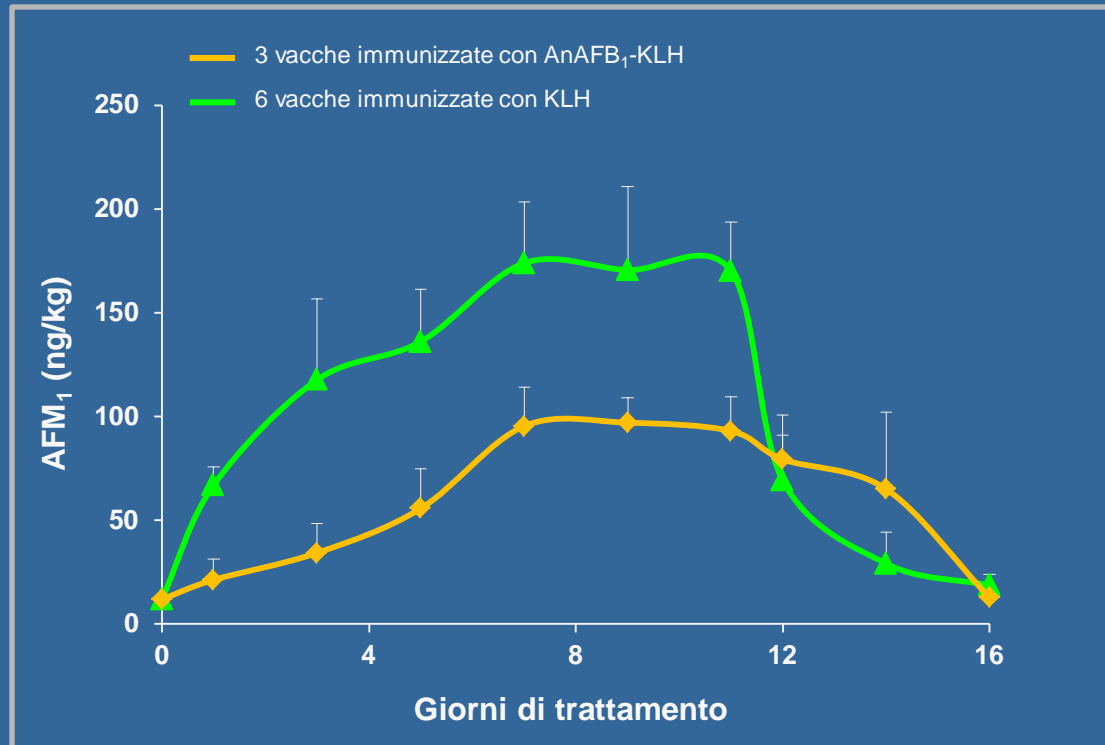
Considerando la totalità del latte prelevato nei cinque giorni di plateau è stato possibile determinare, negli animali immunizzati con AnAFB₁-KLH, una riduzione media del 20% del quantitativo di AFM₁ escreta rispetto ai controlli

È stata riscontrata una elevata correlazione tra concentrazione di AFM₁ escreta al plateau e titolo di Ab specifici per AFB₁



Quantificazione di AFM₁ escretata nel latte di vacche “high-responder” in seguito a somministrazione di AFB₁

Polonelli L. et al. PLoS ONE, October 2011 | Volume 6 | Issue 10 | e26777



La concentrazione di AFM₁ allo stato di plateau è risultata inferiore del 46% rispetto a quella rilevata nel latte delle vacche di controllo



Immunizzazione di manze con quattro dosi di diverse formulazioni vaccinali basate su coniugati proteici di AnAFB₁

Giovati L. et al. Submitted for publication

Gruppo	Antigene	Adiuvante	Animali
1	AnAFB ₁ -KLH	CFA (1 ^a dose) and IFA (dosi successive)	6
2	AnAFB ₁ -KLH	IFA (4 dosi)	3
3	AnAFB ₁ -KLH	Al(OH) ₃ (4 dosi)	4
4	AnAFB ₁ -CRM ₁₉₇	CFA (1 ^a dose) and IFA (dosi successive)	3
5	AnAFB ₁ -CRM ₁₉₇	Al(OH) ₃ (4 dosi)	3

CFA: adiuvante di Freund completo; IFA: adiuvante di Freund incompleto; Al(OH)₃: idrossido di alluminio

La schedula di immunizzazione ha previsto la somministrazione di una prima dose da 500 µg di AnAFB₁-KLH o 300 µg di AnAFB₁-CRM 197 con adiuvante, come descritto, seguita da tre dosi contenenti lo stesso quantitativo di antigene



Distribuzione di manze high, low e non-responders nei diversi gruppi al termine della vaccinazione

Giovati L. et al. Submitted for publication

		Non-responder	Responder		
		(titolo < 1,000)	Low-responder (titolo 1,000-10,000)	High-responder (titolo ≥ 10,000)	
AnAFB ₁ -KLH	CFA / IFA	Gruppo 1 (n = 6)	-	-	6
	IFA	Gruppo 2 (n = 3)	2	1	-
	AIOH ₃	Gruppo 3 (n = 4)	4	-	-
AnAFB ₁ -CRM197	CFA / IFA	Gruppo 4 (n = 3)	-	2	1
	AIOH ₃	Gruppo 5 (n = 3)	1	2	-

La formulazione più efficace è AnAFB₁-KLH in CFA/IFA

La vaccinazione è più efficace in manze piuttosto che in vacche



Somministrazione di AFB₁ e quantificazione di AFM₁ escreta nel latte

Giovati L. et al. Submitted for publication

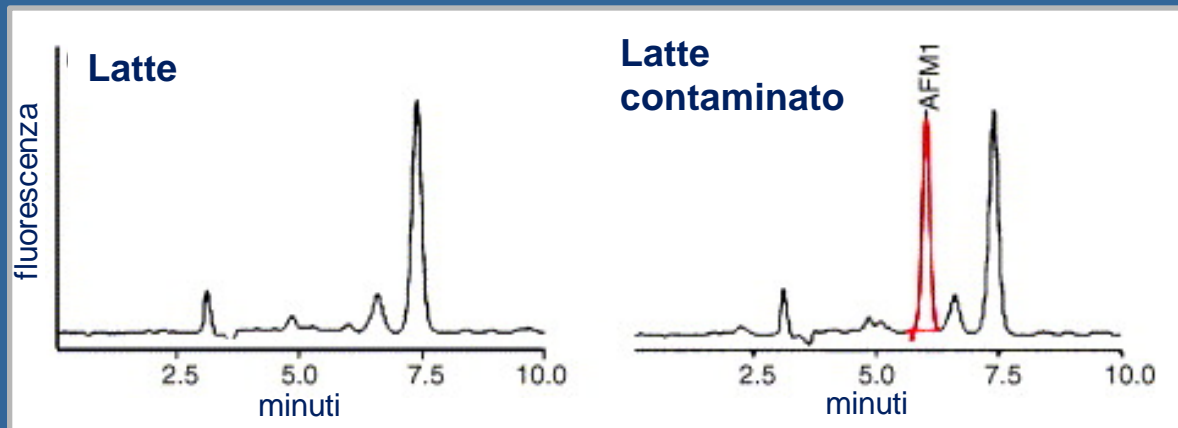


In seguito all'inizio della produzione latte somministrazione di mangime contaminato

140 µg AFB₁/capo per 11 giorni

Prelievo di campioni di latte da 2 mungiture giornaliere)

Analisi dei campioni di latte mediante HPLC – fluorescenza

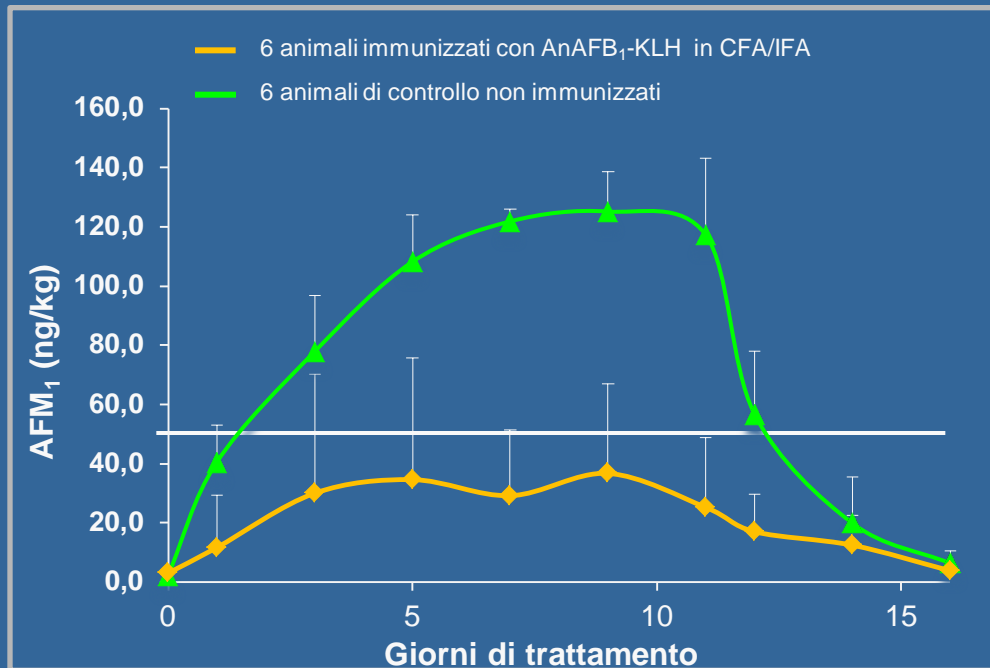


Determinazione della concentrazione di AFM₁ mediante analisi comparativa di cromatogrammi di soluzioni standard a concentrazione nota



Quantificazione di AFM₁ escreta in seguito a somministrazione di AFB₁

Giovati L. et al. Submitted for publication



In seguito al parto ed inizio della produzione latte sono stati somministrati 140 µg AFB₁/capo per 11 giorni

La valutazione comparativa dell'escrezione di AFM₁ negli animali vaccinati e di controllo è stata effettuata al raggiungimento del plateau

La concentrazione di AFM₁ allo stato di plateau è risultata inferiore del 74% rispetto a quella rilevata nel latte delle vacche di controllo

La concentrazione di AFM₁ è risultata sempre inferiore al limite imposto dalla UE (50 ng/kg)



Conclusioni

È stato sviluppato un vaccino bovino basato su un antigene non tossico (AnAFB₁) che, coniugato a KLH, si è rivelato efficace per la prevenzione del trasferimento di AFB₁ sottoforma di AFM₁ nel latte di vacche intossicate

L'immunizzazione di manze prima dell'inizio della produzione latte può rappresentare, in particolare, una strategia più efficace per la riduzione del rischio di aflatossicosi umana dovuta ad ingestione di latte contaminato o suoi derivati



Ringraziamenti

Grazie per l'attenzione