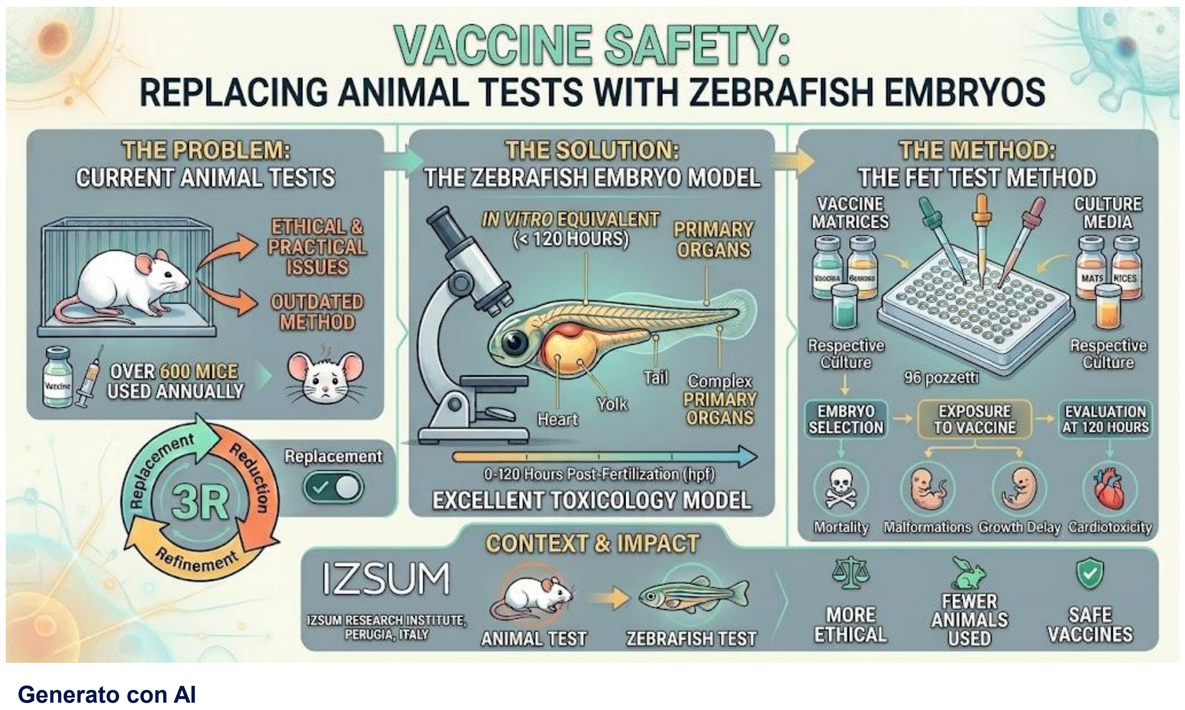
Valutazione dell ’embriotossicità di due vaccini stabulogeni veterinari e relativi terreni di coltura mediante Fish Embryo Toxicity (FET) test

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE "TOGO ROSATI"



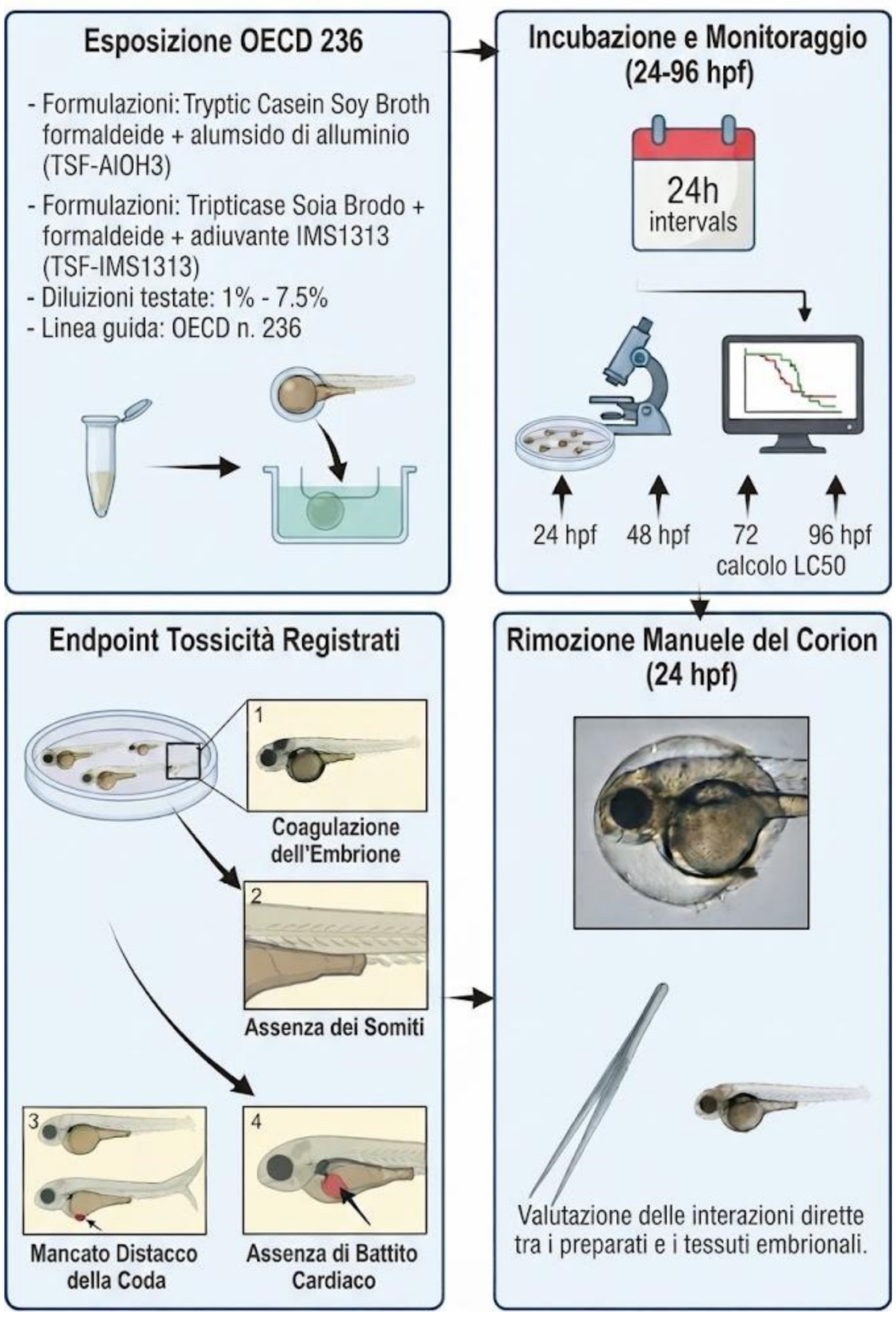
§ presentig author Di Paolo A.

SUMMARY



Generato con AI

MATERIALI E METODI



Generato con AI

BIBLIOGRAFIA

1)DIRETTIVA 2010/63/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici;

2) OECD (2013), Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264203709-en

3)Decreto del Ministero della Sanità n. 287, 17 marzo 1994. https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1994/05/14/094G0348/sg

INTRODUZIONE

Quadro Normativo e Principi delle 3R

La **Direttiva Europea 2010/63/UE** sulla protezione degli animali impiegati a fini scientifici promuove la rigorosa applicazione del **principio delle 3R** (Replacement, Reduction, Refinement).

In questo scenario, gli embrioni di *Danio rerio* (Zebrafish) si pongono come un modello vertebrato "animal-free" di elevato valore scientifico. Dal punto di vista normativo, l'impiego di questi embrioni entro le 120 ore post-fecondazione (hpf) è considerato a tutti gli effetti equiparabile a un test in vitro. Tale finestra temporale consente di studiare la risposta a sostanze esogene su un organismo dotato di un sistema circolatorio attivo e di organi primari complessi già formati, evitando l'impiego di animali adulti o sviluppati.

Produzione e Controllo dei Vaccini Stabulogeni Veterinari

I vaccini stabulogeni (o autogeni) costituiscono una categoria speciale di preparazioni farmaceutiche veterinarie realizzate su misura a partire da isolati batterici o virali prelevati da uno specifico focolaio epidemico. In Italia, la loro produzione è riservata agli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (II.ZZ.SS.) previa autorizzazione ministeriale (D.M. n. 287/1994) nei casi in cui non esistano vaccini commerciali idonei per l'agente eziologico di interesse. Trattandosi di farmaci immunologici destinati all'impiego sul campo, queste formulazioni richiedono severi controlli di qualità e la verifica della totale assenza di patogenicità residua prima di poter essere immesse sul mercato.

Limiti dei Metodi Attuali e Necessità di Sostituzione dei Test *In Vivo*

Attualmente, presso l'Officina Farmaceutica dell'IZSUM di Perugia, i vaccini a matrice Gram-negativa sono regolarmente controllati con metodi in vitro (come il saggio LAL per l'endotossina batterica, affiancato da valutazioni su saggi MTS e MAT). Al contrario, il controllo della patogenicità residua per le matrici Gram-positive e virali richiede ancora oggi il saggio in vivo su modello murino, con un impiego di circa 600 topi all'anno. Tale approccio appare ormai obsoleto, privo dell'efficienza dei metodi moderni e fortemente penalizzato da limitazioni etiche e pratiche, rendendo urgente l'adozione di standard alternativi in linea con l'evoluzione normativa.

Obiettivo dello Studio: Il FET Test come Alternativa Scientifica ed Etica

Questo lavoro descrive l'applicazione del saggio di tossicità sugli embrioni di pesce (Fish Embryo Toxicity - FET test) per la valutazione della sicurezza di due matrici di vaccini autogeni e dei rispettivi terreni di coltura prodotti dall'IZSUM. Il saggio permette di monitorare endpoint strutturali, fisiologici e di mortalità entro le 120 hpf, fornendo un profilo tossicologico accurato e riproducibile.

RISULTATI E CONCLUSIONI

·I campioni non diluiti hanno causato il 100% di mortalità entro le prime 24 hpf.

Le prove condotte sulle diluizioni hanno evidenziato una netta tossicità dose-dipendente.

·Saggi di disaggregazione delle cause di mortalità hanno dimostrato che il terreno base TSB possiede un'intrinseca embriotossicità, provocando il 100% di mortalità alla diluizione del 5%.

La formaldeide, diluita alle medesime concentrazioni di lavoro a partire da una base dello 0,05%, non ha indotto alcun effetto letale.

·L'esposizione di embrioni decorionati ha restituito percentuali di mortalità (48%) sovrapponibili agli embrioni con corion (52,5%).

·Questi dati dimostrano che i componenti biologici interagiscono in modo sistemico con l'organismo e non si limitano a ridurre gli scambi gassosi della membrana del corion.

·Il FET test su embrioni di Danio rerio si conferma uno strumento d'indagine altamente sensibile, riproducibile e conforme ai parametri etico-normativi europei.

·Una quota rilevante dell’ embriotossicità registrata non deriva dagli antigeni o dai classici agenti inattivanti, ma è intrinsecamente legata alle matrici dei terreni di coltura.

·I risultati ottenuti pongono le basi per futuri protocolli di refinement e supportano fortemente l'impiego di metodiche animal-free per il controllo di qualità nell'industria del farmaco veterinario stabulogeno.

Tabella 1. Numerosità, Media, Deviazione Standard e Mediana dei parametri analizzati.

Matrice Vaccinale	Cp.	Media	Deviazione Standard	Mediana
Escherichia coli	*52*	*58,0*	*36,0*	*54,7*
Salmonella abortus ovis	*28*	*31,2*	*20,6*	*23,3*

SOME RIGHTS RESERVED

Quest'opera è stata rilasciata sotto la licenza Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia. Per leggere una copia della licenza visita il sito web http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/ o spedisci una lettera a Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.