

Mattilsynet, Hovedkontoret
postmottak@mattilsynet.no

Dato: 02.09.2021

Uttalelse om alternativer til påvisning av toksin fra *Clostridium botulinum*

Oppdrag:

Den 9. juni 2021 fikk Forsøksdyrkomiteén en henvendelse fra Forsøksdyrforvaltningen hvor de ber komiteén om å utrede alternativene til påvisning av toksin fra *Clostridium botulinum* og ber om en uttalelse om hvordan vi kan gå over til dyrefrie metoder i Norge, og hvor raskt dette kan gjøres.

Bakgrunn:

Tradisjonelt er mus brukt til påvisning av botulinumtoksin. Dette foregår ved at pasientserum eller supernatant fra bakteriekultur injiseres intraperitonealt i musene. Musene overvåkes deretter i inntil 4 døgn med fokus på kliniske tegn som er spesifikke for botulisme. Formålet er å diagnostisere botulisme hos mennesker, dyr eller i fôr. Forsøkene er definert som betydelig belastende og det er ønskelig å finne alternativer. I tillegg er dette ofte saker som haster, så det er vanskelig å planlegge i forveien. Når prøven som skal testes kommer inn har man ofte kort tid på seg, og derfor brukes ofte overskuddsdyr til dette formålet. Det betyr at musene som brukes ikke er standardiserte, de varierer i alder, kjønn, vekt og stamme fra gang til gang. Dette kan resultere i at konklusjonen på testen kan ha lav reproducerbarhet. Det er NMBU som har referanselaboratoriet for påvisning av botulinumtoksin i Norge. I Norge har det blitt brukt under 10 mus i året de siste årene til dette formålet.

Arbeidet med å finne alternativer til denne analysen har allerede pågått i flere tiår (Bottrill, 2003; Sesardic, 1999; Straughan, 2006)

Andre steder i verden har botulinumtoksinet andre medisinske anvendelsesområder, som for eksempel mot muskelpasmer. Toksinet har også kosmetiske bruksområder, som for eksempel mot rynker. Bruken av dyr til testingen tilhørende denne produksjonen har vært kritisert for å bryte med EU sitt direktiv fra 2013 mot å bruke dyr til testing av kosmetikk (Blitz, 2010; Gericke, 2019; Taylor et al., 2019). Flere selskap har utviklet *in vitro*-tester for dette. Allergan fikk godkjent et *in vitro*-alternativ i 2011 som er godkjent i EU, Canada og USA (DLN, 2011). Merz fikk godkjent et *in vitro*-alternativ i 2015 i Tyskland (MerzPharma, 2015), og i 2018 fikk Ipsen et *in vitro*-alternativ godkjent i EU (IVJ, 2018).

Folkehelseinstituttet deltar i et EU-prosjekt, EuroBioTox, som ble etablert blant annet for å sammenligne ulike alternative metoder med musetesten og utvikle en ny validert og kvalitetssikret *in vitro*-metode. Dette prosjektet skal avsluttes i 2022, og årsrapporten for 2020 viser at de første delene av metoden allerede er tilgjengelig (<https://eurobiotox.eu>). Prosjektet har også produsert en artikkel hvor de redegjør for arbeidet så langt (Zeleny et al., 2019).

Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) i Sverige etablerte en spektrometrisk, dyrefri metode i 2017 som brukes for å analysere botulinumtoksin i prøver fra dyr (<https://www.sva.se/vi-erbjuder/analyser/clostridium-botulinumtoxin/c-28/c-76/p-938>). Denne testen er grundig validert (Björnstad et al., 2014; Tevell Åberg et al., 2021). Folkhälsomyndigheten i Sverige sender prøver fra mennesker til Statens Serum Institut i Danmark. De bruker fortsatt musetesten, men de jobber også

med å erstatte den med Endopeptidase-MALDI-TOF testen. I tillegg jobber Uppsala Universitet med et prosjekt for å lage en cellebasert metode (https://www.uu.se/en/research/projects/selected-project/?researchId=2019-01811_VR), dette prosjektet skal også avsluttes i 2022.

I 2019 publiserte Hobbs *et al.* en review artikkel hvor de gjennomgikk alternativer for påvisning av botulinumtoksin. De vurderte ELISA, Lateral flow assays (LFAs), Immuno-PCR/Liposome-PCR tester, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on a Chip (EOC), biosensor-teknologi, Fluorescent Resonance Energy Transfer Assay (FRET), Flow Cytometry, Fluorescence Endopeptidase Assay, Centrifugal Microfluidic Technology, Electrochemiluminescence Immunoassay, Cyclic Voltammetry and Electrochemical Impedance Spectroscopy, Immuno-Detection of Cleavage Product, Endopeptidase Mass Spectrometry, UV/Visible Spectroscopy—Colorimetric Assay, Surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection og cellebaserte tester som SNAP 25-testen. De konkluderte med at dyrefrie tester burde velges framfor musetesten, for å etterfølge de 3R'ene (replace, reduce og refine), og at alle disse testene har lavere kostnad enn musetesten. De konkluderer videre med at de 4 testene som er nærmest til å erstatte musetesten er: Centrifugal microfluidic assay, colorimetric assay, SPR-based biosensor og EIS platformen (Hobbs et al., 2019).

I 2020 publiserte Nepal & Jesong en ny reviewartikkel hvor de gjennomgikk alternativer til påvisning av botulinumtoksin. De vurderte SNAP 25-testen, Mouse phrenic nerve hemidiaphragm (MPN) testen, Non-lethal mouse flaccid paralysis assay (NFPA) testen, immunoassays, tester som registrerer botulinumtoksinets katalytiske aktivitet, celleforsøk og nukleinsyrediagnostikk. Deres konklusjon var at en av disse eller en kombinasjon av dem kan erstatte musetesten. De skriver at US FDA godkjente bruken av ELISA- og PCR-teknikker til analyse av botulinumtoksin i 2017, med en anbefaling om at positive tester burde verifiseres med musetesten. I tillegg utvikles det for tiden et lovverk i Korea som skal promotere bruken av alternativer og redusere bruken av levende dyr i slike forsøk (Nepal & Jeong, 2020).

Forsøksdyrkomitéens uttalelse:

Forsøksdyrkomitéen vektlegger at de 3R'ene (replace, reduce og refine) er sentrale i forsøksdyrlovverket og skal etterstrebes innenfor alle felt i forsøksdyrbransjen. Så fort det finnes gode alternativer hvor levende dyr ikke benyttes, så skal disse alternativene tas i bruk. Vi ser at det allerede i dag finnes gode alternativer til disse dyreforskene, og at disse er av høy kvalitet og brukes allerede i flere land. Fordelene med å ta i bruk slike *in vitro*-alternativer er flere; dyrevelferden forbedres, man sparer penger og i tillegg vil man øke standardiseringen og reproduserbarheten.

Vi anbefaler at Forsøksdyrforvaltningen med hjemmel i forsøksdyrforskriftens §11 avslår søknader om bruk av levende dyr til påvisning av botulinumtoksin. Det erkjennes at Norge i dag bruker få levende dyr til dette formålet. Men det er ikke antall dyr som skal være avgjørende for om levende dyr skal brukes, men om det finnes gode alternativer.

Når det gjelder når og hvordan dette skal gjøres anbefaler vi at dette gjøres på samme måte som allerede gjøres for alternative metoder for produksjon av antistoffer, ved at Forsøksdyrforvaltningen henvender seg direkte til avdelingene som bruker musetesten, stiller krav om utfasing og setter en dato for når *in vitro*-testen skal være innført.

Komitéens godkjenning av uttalelsen:

Denne uttalelsen er godkjent av komitéens medlemmer: Espen Engh, Grete Bæverfjord, Jenny Mattisson, Susanna Lybæk, Hogne Bleie, Kathrine Ryeng og Kristine Hansen, Tore S Kristiansen. Imot: Ingen.

Uttalelsen er signert av komitéens leder: Tore S Kristiansen.



Tore S Kristiansen

Leder for Forsøksdyrkomitéen – Norges nasjonale komité for beskyttelse av forsøksdyr.

Referanser:

- Björnstad, K., Tevell Åberg, A., Kalb, S. R., Wang, D., Barr, J. R., Bondesson, U., & Hedeland, M. (2014). Validation of the Endopep-MS method for qualitative detection of active botulinum neurotoxins in human and chicken serum. *Anal Bioanal Chem*, 406(28), 7149-7161. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8170-4>
- Blitz, S. (2010). The Botulinum neurotoxin LD50 test - problems and solutions. *ALTEX*, 27(2), 114-116. <https://doi.org/10.14573/altex.2010.2.114>
- Bottrill, K. (2003). Growing old disgracefully: the cosmetic use of botulinum toxin. *Altern Lab Anim*, 31(4), 381-391. <https://doi.org/10.1177/026119290303100404>
- DLN. (2011). *Allergan's Animal-Free In Vitro, Cell-Based Assay FDA-Approved*. Dermatology Learning Network. <https://www.hmpgloballearningnetwork.com/site/thederm/content/allergans-animal-free-vitro-cell-based-assay-fda-approved>
- Gericke, C. (2019). *Botox - Animal cruelty for a questionable beauty*. Doctors Against Animal Experiments. <https://www.aerzte-gegen-tierversuche.de/en/index.php/resources/cosmetics/52-botox-animal-cruelty-for-a-questionable-beauty>
- Hobbs, R. J., Thomas, C. A., Halliwell, J., & Gwenin, C. D. (2019). Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins-A Review. *Toxins*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/toxins11070418>
- IVJ. (2018). *Finally: Ipsen receives approval from EU and Switzerland for cell assay to test Dysport and Azzalure*. InVitroJobs. <https://www.invitrojobs.com/index.php/en/news/news-archive/item/3687-finally-ipen-receives-approval-from-eu-and-switzerland-for-cell-assay-to-test-dysport-and-azzalure>
- MerzPharma. (2015). *Landmark Change for Botulinum Neurotoxin: Alternative Test Method Approved in the U.S.* <https://www.merz.com/blog/news/botulinum-neurotoxin/>
- Nepal, M. R., & Jeong, T. C. (2020). Alternative Methods for Testing Botulinum Toxin: Current Status and Future Perspectives. *Biomolecules & Therapeutics*, 28(4), 302-310. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2019.200>
- Sesardic, D. (1999). Alternatives to the use of animals for bacterial toxins and antitoxins. *Developments in Biological Standardization*, 100, 75-82.

- Straughan, D. (2006). Progress in applying the Three Rs to the potency testing of Botulinum toxin type A. *Altern Lab Anim*, 34(3), 305-313. <https://doi.org/10.1177/026119290603400314>
- Taylor, K., Gericke, C., & Alvarez, L. R. (2019). Botulinum toxin testing on animals is still a Europe-wide issue. *ALTEX*, 36(1), 81-90. <https://doi.org/10.14573/altex.1807101>
- Tevell Åberg, A., Karlsson, I., & Hedeland, M. (2021). Modification and validation of the Endopep-mass spectrometry method for botulinum neurotoxin detection in liver samples with application to samples collected during animal botulism outbreaks. *Anal Bioanal Chem*, 413(2), 345-354. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-03001-z>
- Zeleny, R., Rummel, A., Jansson, D., & Dorner, B. (2019). Challenges in the Development fo Reference Materials for Protein Toxins. *Robert Koch Institute*. <https://doi.org/10.25646/6275>