

## **P1.1b - METODOLOGIE INNOVATIVE PER LA DETERMINAZIONE DI PARASSITI ZONOTICI NEI PRODOTTI ITTICI:**

**Borsista FILAS:** da reclutare entro marzo 2017.

Nel corso del primo anno sono state messe a punto metodiche RT-PCR per l'identificazione di alcuni parassiti zoonotici, appartenenti ai generi *Anisakis* (*A. simplex* (s. s.) e *A. pegreffii*) e *Pseudoterranova* (*P. decipiens* (s. s.), *P. krabbei* e *P. bulbosa*) (Mattiucci & Nascetti, 2008, Adv. Parasitol, 66: 47-148). Queste specie parassitano, allo stadio larvale, specie ittiche di interesse commerciale in acque Europee. La metodica RT-PCR è stata messa a punto mediante l'impiego di sistemi primers/sonde specie-specifici, costruiti su sequenze del gene mtDNA *cox2*. Ogni coppia di primers e relativa sonda, sono stati disegnati in punti diversi della sequenza del gene mtDNA *cox2* (629 bp per le specie appartenenti genere *Anisakis*; 519 bp per quelle del genere *Pseudoterranova*), che presentava basi diagnostiche per ciascuna specie. A tal fine, sono state utilizzate sequenze di mtDNA *cox2* già precedentemente ottenute per le suddette specie dal responsabile dell'ricerca (Mattiucci et al., 2014 JParasitol,100, 2014, 199–214; Timi et al., 2014 Vet Parasitol 199: 59– 72 ). Poiché i primers e soprattutto le sonde, devono rispettare determinate caratteristiche stringenti, la "funzionalità" di ogni coppia di primers e relativa sonda, è stata verificata mediante il software primer3. Il passaggio successivo è stato quello di marcare ogni specifica sonda (associata ad una singola specie di anisakide target) con un fluoroforo caratterizzato da un'emissione ad una determinata lunghezza d'onda, che ha permesso di osservare un segnale di fluorescenza in caso di avvenuta amplificazione.

Sono state quindi eseguite diverse reazioni al fine di determinare le  $T_a$  (60°C) e concentrazioni ottimali per ciascun sistema "primers/sonda specie specifica" (0.2µM/0.5 µM, rispettivamente). Nello step successivo, ogni sistema specifico "primers/sonda" è stato testato dapprima in singleplex, con reazioni in triplicato, in modo da verificarne l'effettiva specificità e funzionalità. Questa prima parte di esperimenti ha consentito dunque di mettere a punto 5 "sistemi primers/sonda" per l'identificazione di ciascuna della 5 specie target, *A. simplex* (s. s.), *A. pegreffii*, *P. decipiens* (s. s.), *P. krabbei* e *P. bulbosa*, mostrando una buona specificità per tutte le specie considerate; i segnali di fluorescenza sono risultati sufficientemente elevati. Un altro aspetto della fase sperimentale, è stato quello di determinare il Limit Of Detection (LOD) per ognuna delle 5 specie target (*A. simplex* (s. s.), *A. pegreffii*, *P. decipiens* (s. s.), *P. krabbei* e *P. bulbosa*). A tal fine, sono state fatte 16 diluizioni seriali 1:2 a partire da una concentrazione nota di 20 ng/µl, separatamente per ciascuna delle 5 specie parassite in esame, al fine di testare il limite minimo di concentrazione di DNA rilevabile con questo metodo. Con questo esperimento è stato possibile determinare la minima concentrazione di DNA rilevabile da questo sistema (LOD), che è risultata corrispondente ad un valore inferiore a 0.0006 ng/µl.

Successivamente, per ogni specie di anisakide, è stata realizzata una curva di calibrazione per poter effettuare la quantificazione di un campione unknown di DNA; anche in questo caso si è proceduto alla costruzione delle rette di taratura, preparando 5 diluizioni seriali 1:5 (5 punti) a partire da una concentrazione di 50 ng/µl. E' stata poi effettuata la reazione di amplificazione a seguito della quale lo strumento ha calcolato automaticamente l'Efficienza (E) della reazione secondo la formula:  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ , dove slope è un valore associato alla pendenza della retta. Un valore teorico uguale a 2 (E=2) indica un'efficienza della reazione pari al 100%, condizione però quasi impossibile da realizzare in fase sperimentale, a causa dell'influenza di diversi fattori che possono far divergere il risultato dalla perfezione dell'efficienza (E=2). Una volta ottenute le rette di taratura per ogni specie target, queste possono essere salvate e richiamate (aggiungendo alla "semina" dell'esperimento almeno un punto di diluizione con cui è stata costruita la retta di taratura) dal software dello strumento durante la reazione di quantificazione, per determinare la concentrazione di DNA del campione presente nella reazione, intersecando la curva del campione standard con il Crossing point (Cp) del campione unknown. Le curve standard relative alle 5 specie target hanno mostrato valori di pendenza (slope) compresi tra -3.08 and -3.29, con valori di efficienza di PCR (E) compresi tra 2.01 e 2.10, molto vicini all'optimum.

Dopo aver verificato la corretta funzionalità dei primers e delle relative sonde, è stata verificata la loro applicabilità anche in reazioni in multiplex; a tal fine, è stata effettuata un'estrazione di DNA genomico, simultaneamente, da 4 larve appartenenti rispettivamente alle specie *A. simplex* (s. s.), *A. pegreffii*, *P.*

*decipiens* (s. s.) e *P. bulbosa*, ed è stata realizzata una reazione in multiplex, in cui nella mix sono stati inseriti tutti i sistemi "primers/sonda" specifici per le specie in esame (4 sonde, per un massimo di 4 fluorofori). L'utilizzo di questi sistemi primers/sonde specie specifici, hanno permesso di ottenere un buon risultato, consentendo di poter discriminare la presenza di 4 specie contemporaneamente, con un'unica reazione di amplificazione.

Questo metodo può essere utilizzato per identificare a livello di specie un gran numero di esemplari con un'unica reazione, riducendo tempi e costi rispetto al metodo classico di amplificazione e sequenziamento.

Il suddetto sistema, inoltre, può essere utilizzato come metodo di diagnosi molecolare dei casi clinici di anisakiasi, permettendo l'identificazione a livello di specie dell'agente eziologico, a partire da biopsie tissutali e sezioni istologiche (inclusioni in paraffina o sezioni istologiche montate su vetrino). Ciò è stato condotto su campioni di sezioni istologiche e biopsie di tessuti prelevati in casi di anisakiasi umana accertata.

Infine, in considerazione del fatto che alcune anisakidi zoonotici - che più frequentemente sono all'origine di casi umani di anisakiasi (*A. pegreffii* ed *A. simplex* (s.s.) - possono co-infettare parti edibili di specie ittiche di importanza commerciale (Cipriani et al., 2014 Int J. Food Microbiol, 198 1-8) è stata implementata la metodica RT-PCR per rilevare/identificare il DNA delle due specie direttamente all'interno del filetto del pesce infetto. A tal fine, sono stati condotti esperimenti relativi alle due specie di *Anisakis* in cui una quantità fissa di filetto di pesce (10g) è stata infettata artificialmente con un numero decrescente di larve del parassita, da un massimo di 5, fino a mezza larva, con un decremento di mezza larva per ogni saggio (10 saggi totali). In entrambi gli esperimenti condotti sul filetto del pesce infestato artificialmente, le reazioni hanno permesso di rilevare il DNA di *A. pegreffii* e *A. simplex* (s. s.) in tutti e 10 i saggi, rispettivamente, anche quello con una minima quantità di parassita, corrispondente a mezza larva.

#### **Attività previste per il II° anno:**

Per il secondo anno del progetto, un obiettivo sarà quello di disegnare e testare ulteriori sistemi primers/sonda per altre specie appartenenti ai generi *Anisakis*, *Pseudoterranova* e *Hysterothylacium*. Inoltre, verranno implementate le metodiche per individuare la presenza del loro DNA nel filetto del pesce, analogamente a quanto già realizzato sperimentalmente per le specie *A. pegreffii* e *A. simplex* (s. s.).