

PROGETTI DI "RICERCA CORRENTE 2010"

N. identificativo progetto: IZS SA 02/10= RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA SARDEGNA

Area tematica: Sanità Animale

Titolo del progetto:

Studio sulle interazioni ospite-parassita tra
***Anisakis* sp. e pesce**

Responsabile Scientifico: Prof. Fulvio Salati

Presentazione complessiva del progetto

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA SARDEGNA

N° identificativo progetto: **IZS SA 02/2010**

1. Titolo del progetto

Studio sulle interazioni ospite-parassita tra *Anisakis* sp. e pesce

2. Durata del progetto (espressa in mesi): 18

3. Area tematica: Sanità Animale

4. Responsabile scientifico del progetto

CognomeSalati..... NomeEulvio.....

QualificaResponsabile Ittiopatologia ed Acquacoltura.....

Telefono028 6356492..... Fax0283 358931.....

E-mailsalati@izs.it o izs@izs.it.....

5. Elenco delle Unità operative impegnate nel progetto

ai n°identi (F.O.)	1	Responsabile (F.O.) Eulvio Salati (IZS Sardegna)
bi n°identi (F.O.)	2	Responsabile (F.O.) Paola Nicolussi (IZS Sardegna)
co n°identi (F.O.)	3	Responsabile (F.O.) Francesco Sardu (ASL 5 - Oristano)

Modulo 1 - Razionale del progetto

Breve sintesi del progetto, con indicazione delle motivazioni, della validità della proposta e degli obiettivi prefissati.

L'anisakiasi è una zoonosi causata dallo stadio larvale L3 di nematodi appartenenti alla famiglia *Anisakidae* che possono essere causa di zoonosi nell'uomo.

L'obiettivo della presente ricerca sarà quello di studiare le interazioni tra *Anisakis* sp. ed il pesce. In particolare, la presente proposta di studio prevede una fase costituita da due linee di ricerca: immunologica e biomolecolare, convergenti, in cui, nella prima, verrà effettuata un'infezione sperimentale in pesci d'allevamento, di cui verrà studiata la risposta immunitaria innata e specifica al parassita. Contemporaneamente, verrà effettuata la caratterizzazione degli antigeni di *A. pegreffii* mediante lo studio dell'mRNA codificante gli allergeni (che potrebbero rivelarsi caratteristici e o tipici) al fine di ottenere degli antigeni ricombinanti.

I risultati che si vogliono raggiungere in questo studio prevedono pertanto la determinazione della presenza/assenza di antigeni del parassita nel siero e/o nei muscoli del pesce e/o la presenza/assenza di anticorpi anti-*Anisakis* rilevabili dai muscoli o dalla cute del pesce parassitato.

Descrizione complessiva del progetto

Formulare una sintesi (min. 3 - max. 7 pagine, Times New Roman 12) rappresentativa dell'attività di ricerca di tutte le unità operative impegnate.

Anisakis sp. presenta un ciclo biologico che si svolge prevalentemente in ambiente marino e che ha quindi ospiti intermedi (crostacei, pesci e cefalopodi) e per ospiti definitivi i cetacei. L'anisakiasi è una zoonosi causata dallo stadio larvale L3 di nematodi appartenenti alla famiglia *Anisakidae*. L'uomo in questo contesto rappresenta un ospite accidentale (paratenico) che entra in contatto con questo parassita mediante ingestione di pesce crudo o poco cotto.

Recentemente, si registra un aumento di questa parassitosi nella popolazione europea per via della diffusione sia di piatti tradizionali che prevedono la marinatura di alici (Italia e Spagna), del gravlax (salmone, Norvegia) e delle frittelle salate od affumicate a freddo (Olanda e Danimarca), sia dell'introduzione e la commercializzazione di piatti tipici orientali, tra cui il più conosciuto è il sushi (Giappone). Infatti, il Giappone, importante consumatore di pesce crudo, è il paese con il più alto numero di casi di anisakiasi umana, caratterizzata da sintomi gastriche acute e croniche, oltre che da sindromi di ipersensibilità agli allergeni di questo nematode. Per ovviare a questo problema i Sistemi Sanitari nazionali europei applicano normative comuni che impongono particolari condizioni di trattamento e conservazione del pescato prima della sua commercializzazione (Reg. CE 853/2004).

Gli allergeni possono tuttavia permanere sul pesce infestato nonostante trattamenti di congelamento, marinatura o cottura, per cui anche il pesce cotto, che è un alimento importante nella dieta dei popoli mediterranei, può rappresentare una fonte di sensibilizzazione nell'uomo.

Nel pesce, la principale forma di prevenzione è data dall'esame spettroscopico effettuato dai

Servizi Veterinari, mentre poco o nulla si sa sull'interazione ospite-parassita tra *Amsakis* sp. e pesce. Per quanto riguarda questa specifica fase del ciclo del parassita, sarebbe interessante poter evidenziare ed identificare gli antigeni del parassita e/o gli anticorpi contro il parassita nei pesci destinati al consumo umano.

In bibliografia, sono riportati nove allergeni tipici di *Amsakis simplex* (principalmente proteine ES (escretive-secretive del parassita) (Audicana and Kennedy, 2008; Rodriguez-Perez *et al.*, 2008). Tuttavia, nessuno studio è stato effettuato su *A. pegreffi*, la specie più diffusa nel Mediterraneo occidentale, inoltre, non risultano chiare le differenze a livello di sequenza proteica tra queste due specie di *Amsakis*. Lo scopo ed obiettivo finale a lungo termine della presente ricerca è pertanto quello di porre le basi scientifiche per l'eventuale sviluppo di un sistema diagnostico identificativo semplice da utilizzarsi per un rapido riconoscimento di "pesce parassitato da *Amsakis*". Al fine di poter raggiungere tale obiettivo, è quindi necessario uno studio iniziale approfondito sull'eventuale differenza degli antigeni tra le due specie del parassita e contemporaneamente uno studio della risposta immunitaria dei pesci ad *A. pegreffi*.

Sintetica descrizione del progetto

La presente proposta prevede due fasi temporali distinte:

La **ricerca** consisterà in due linee di studio convergenti, immunologica e biomolecolare,

a) Studio della risposta immunitaria dei pesci parassitati.

L'infezione sperimentale, indotta mediante somministrazione di larve L3 di *A. pegreffi*, verrà effettuata in acquari su orate *Sparus aurata* d'allevamento in cui verrà valutata la risposta immunitaria innata e specifica, con particolare attenzione a quella umorale. In particolare, nei pesci parassitati e nei controlli verranno determinati l'attività del complemento-like ed il titolo degli anticorpi agglutinanti (e/o ELISA), che tuttavia non sempre nei pesci fornisce risultati più accurati del precedente (Viale *et al.*, 2006; Rubio-Godoy, 2003). Il titolo anticorpale verrà determinato inizialmente nel siero, ma anche nel muco e/o intestino e/o muscolo e la frazione anticorpale (IgM) verrà isolata mediante cromatografia su colonna 1^{da} da segnalare che la variazione del titolo anticorpale in seguito all'esposizione del pesce al suddetto nematode non è mai stata investigata in maniera approfondita.

Inoltre, antigeni grezzi e purificati verranno ottenuti da larve *Amsakis* mediante isolamento diretto e purificazione chimica oppure mediante coltura delle stesse (Oreste e Corsini, 2000).

b) Studio biomolecolare degli antigeni.

Parallelamente e contemporaneamente allo studio immunologico, ne verrà effettuato uno avente lo scopo di caratterizzare, nelle larve di *A. pegreffi*, gli mRNA codificanti specifici antigeni. Partendo da sequenze conosciute di allergeni di *A. simplex* è possibile effettuare l'isolamento di mRNA mediante RT-PCR con primer specifici e clonaggio su vettore per effettuare il sequenziamento. L'analisi delle sequenze e la codifica in triplette ci consentirà di effettuare un'analisi comparativa sulle sequenze proteiche già presenti in banca dati.

L'obiettivo è quello di riconoscere almeno 2-3 antigeni specifici di *A. pegreffi* analizzando mRNA da larve, possibilmente e, se del parassita, utilizzate, che anche già testate come trizolo o

kit di isolamento di RNA totale)

I diversi soggetti partecipanti alla ricerca contribuiscono rispettivamente per:

PT-O-1 - studi immunologici sul pesce;

- Estrazione degli antigeni parassitari;
- Produzione di antigeni ricombinanti

PT-O-2 - produzione di anticorpi policlonali

PT-O-3 - reperimento di parassiti vivi dal mercato

Fasi della ricerca

Parte I

Immunologia

- ia) Isolamento di larve L3 di *T. pegrethi* da pesci infestati naturalmente
- iaa) Infezioni sperimentali *in vivo* in orate, *S. aurata*, d'allevamento con larve L3 di *T. pegrethi*.
- iaa) Studio della risposta immunitaria innata e specifica, con particolare attenzione a quella umorale, nelle orate sperimentalmente infestate e nei campioni di controllo
- iaa) Estrazione e purificazione degli antigeni ottenuti dalle larve del parassita
- iaa) Prelievo dei tessuti muscolari e viscerali dei pesci infestati sperimentalmente per la successiva ricerca degli antigeni

Parte II

Biologia molecolare

- iba) Isolamento di mRNA delle larve *T. pegrethi*, mediante RT-PCR con primer specifici e clonaggio su vettori di espressione per effettuarne il sequenziamento
- iba) Isolamento dell'at-(e) proteina-(e) e purificazione in proteina-(e) monomeric-(e) mediante cromatografia (utilizzo di un service)
- iba) Espressione *in vitro* delle proteine antigeniche ricominate (oppure vettori di espressione, utilizzando cloni preparati in fase I)
- ib) Produzione di anticorpi policlonali e monoclonali (utilizzo di un service) - primi per isolare antigeni naturali di *T. pegrethi* - secondi specifici per gli antigeni ricombinanti necessari per la diagnosi siero-immunologica
- ib) Ricerca degli antigeni del parassita in campioni di pesce parassitato sperimentalmente (estrazione degli antigeni da tessuti muscolari e viscerali dei pesci)

Risultati attesi

1. Risultati previsti al termine dell'attività di ricerca:
1. determinazione della presenza/assenza di antigeni del parassita nel siero e/o nei tessuti (principalmente muscoli) del pesce;
 2. presenza/assenza di anticorpi anti-*Trisakys* rilevabili dai muscoli o dalla cute del pesce parassitato e la valutazione di vantaggi/svantaggi.

Cronogramma del progetto (Max 1 pagina)

Parte I

Immunologia

Isolamento di larve L3 di *T. pegreffi* da pesci infestati naturalmente. Id Infezioni sperimentali (iniettando 8-10 larve *T. pegreffi* in pesci) con larve *T. V. pegreffi* (3-5 mesi)

Studio della risposta immunitaria innata e specifica (3-6 mesi)

Estrazione e purificazione degli antigeni ottenuti dalle larve del parassita (4 mesi)

Prelievo dei tessuti dei pesci infestati sperimentalmente e ricerca antigeni (5 mesi)

Parte II

Biologia molecolare

Isolamento di mRNA delle larve *T. pegreffi*, mediante RT-PCR con primer specifici e clonaggio su vettori di espressione per effettuare il sequenziamento (6 mesi)

Isolamento dell'RNA proteomica e purificazione in proteine omogenee pure mediante cromatografia (utilizzo di un service) (3 mesi)

Espressione *in vitro* delle proteine allergeniche mediante opportuni vettori di espressione, utilizzando i cloni preparati in Fase I (6 mesi)

Produzione di anticorpi policlonali per isolare anticorpi naturali di *T. pegreffi* (6 mesi)

1. Unità Operativa 1

N. identificativo progetto: **IZS SA 02/10 RC** *(riportare il n. identificativo del modulo)*

Numero identificativo dell'Unità Operativa e tipo:
(riportare il n. assegnato nel modulo 1 e indicare se U.O. IZS o EMS)

Ente di appartenenza dell'Unità Operativa

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa

Cognome: Salati Nome: Fulvio

Qualifica: Dirigente Veterinario Responsabile di Laboratorio

Telefono: 028.6256492 Fax: 0783.358931

E-mail: fulvio.salati@hotmail.com

Descrizione del contributo specifico fornito al progetto dall'U.O.
con indicazione delle attività, metodologia e obiettivi perseguiti (max 1 pagina)

Immunologia

- Isolamento di larve L3 di *T. pegreffi* da pesci infestati naturalmente
- Infezioni sperimentali *in vivo* in orate, *S. aurata*, d'allevamento con larve L3 *T. pegreffi*
- Studio della risposta immunitaria innata e specifica, con particolare attenzione a quella umorale, nelle orate sperimentalmente infestate e nei campioni di controllo
- Estrazione e purificazione degli antigeni ottenuti dalle larve del parassita
- Prelievo dei tessuti muscolari e viscerali dei pesci infestati sperimentalmente per la successiva ricerca degli antigeni

Biologia molecolare

- Isolamento di mRNA delle larve *T. pegreffi*, mediante RT-PCR con primer specifici e clonaggio su vettori di espressione per effettuarne il sequenziamento.
- Isolamento della c-ei protein (c-ei) e purificazione in protein (c-ei monomeric) (c-ei) mediante cromatografia (utilizzo di un service)
- Espressione *in vitro* delle proteine allergeniche mediante opportuni vettori di espressione utilizzando i cloni preparati in Fase I

1. Unità Operativa 2

Numero identificativo progetto: **IZS SA 02/10 RC** (riportare lo stesso identificativo del modulo 1)

Numero identificativo dell'Unità Operativa e tipo:

(riportare il n. assegnato nel modulo 1 e indicare se U.O. IZS o FAISL)

Unità di appartenenza dell'Unità Operativa

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa

Cognome: Nicolussi Nome: Paola

Qualifica: Dirigente Veterinario Responsabile di Laboratorio

Telefono: 079 2892269 Fax: 079 272189

E-mail: paola.nicolussi@izs-sardegna.it

Descrizione del contributo specifico fornito al progetto dall'U.O. 2

con indicazione delle attività, metodologia e obiettivi perseguiti (max 1 pagina)

- Produzione di anticorpi policlonali e o monoclonali (utilizzo di un service), i primi per isolare antigeni naturali di *Leishmania* secondo specifici peptidi antigeni ricombinanti eventualmente necessari per la diagnosi siero-immunologica.

1. Unità Operativa 3

N. identificativo progetto: **IZS SA 02/10 RC** *(riportare lo stesso identificativo del modulo 1)*

Numero identificativo dell'Unità Operativa e tipo

(riportare il n. assegnato nel modulo 1 e indicare se U.O. IZS o EMS)

Ente di appartenenza dell'Unità Opera.

Responsabile scientifico dell'Unità Operativa:

Cognome: Francesco Nome: Sardu

Qualifica: Dirigente Veterinario Responsabile di Laboratorio

Telefono: 339 6712820 Fax: 0783 290585

E-mail: sardufrancesco@virgilio.it

Descrizione del contributo specifico fornito al progetto dall'U.O. 3
con indicazione delle attività, metodologia e obiettivi perseguiti (max 1 pagina)

- Collaborazione con i servizi veterinari dell'ASL n. 5 di Oristano nella programmazione ed esecuzione dei campionamenti
- Trattamento dei campioni mediante registrazione col sistema SIGIL A, stoccaggio ed invio all'U.O. 1

Tabella n. 1 - Spese complessive intero progetto

N° identificativo progetto: IZS SA 04/07

Titolo del progetto: Studio sulle interazioni ospite-parassita tra *taeniakia* sp. e pesce

Durata del progetto (espressa in mesi): 18

Responsabile scientifico del progetto: (cognome): Salati Nome: Fulvio

UNITA' IMS

VOCI DI SPESA	UNITA' 1	UNITA' 2	UNITA' 3	TOTALE
- attrezzature	4.000			4.000
- materiale di consumo	10.000			10.000
- personale non dipendente (*)	91.800			91.800
- missioni	1.200			1.200
- spese generali (max. 10%)	3.000			3.000
(1) TOTALE PARZIALE IMS	110.000	0		110.000

UNITA' EMS

VOCI DI SPESA	UNITA' 1	UNITA' 2	UNITA' 3	TOTALE
- materiale di consumo				
- personale non dipendente (*)				
- missioni				
- spese generali (max. 10%)				
(2) TOTALE PARZIALE EMS			0	0
(1+2) TOT. GENERALE	110.000	0	0	110.000

Firma del Responsabile Scientifico

Firma del Direttore dell'IZS

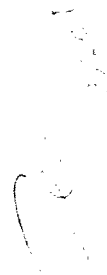





Tabella n. 2 - Spese per U.O. IMS

N. identificativo progetto: IZS SA 02/10

TITOLO del progetto: Studio sulle interazioni ospite-parassita tra *Pinisukia* sp. e pesce

Numero identificativo Unità Operativa: 1 (IMS)

Fonte di appartenenza dell'Unità Operativa: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Responsabile scientifico dell'U.O.: Cognome: Salati Nome: Flavio

VOCI DI SPESA	IMPORTI	DESCRIZIONE
affidamento	1.000	Spettrofotometro e lettore ELISA ecc.
materiali di consumo	10.000	Reagenti e reagenti per immunologia e biologia molecolare
personale contratto	8.000	Contratto x 1 laureato in Medicina Veterinaria (mese da 18/18) contratto x 1 laureato in Scienze
personale	1.200	Biologie (mese da 18/18)
spese generali (max 10%)	5.000	Campionamenti ed incontri relativi alla ricerca
(d) TOTALE	110.000	

Firma del Responsabile Scientifico dell'Unità Operativa

Firma del Responsabile Scientifico del progetto



Tabella n. 2 - Spese per U.O. IVIS

N. identificativo progetto: IZS SA 02 /10

Titolo del progetto: Studio sulle interazioni ospite-parassita tra *Anisakis* sp. e pesce

Numero identificativo Unità Operativa: 2 (IVIS)

Fonte di appartenenza dell'Unità Operativa: Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

Responsabile scientifico dell'U.O.: Cognome: Nicolussi Nome: Pavia

VOCI DI SPESA	IMPORTI	DESCRIZIONE
- attrezzature		
- materiale di consumo		
- personale a contratto		
- missioni		
- spese generali (max. 10%)		
(1) TOTALE	0	

Firma del Responsabile Scientifico dell'Unità Operativa

[Handwritten signature]

Firma del Responsabile Scientifico del progetto



Tabella n. 2 - Spese per U.O. EMS

N. identificativo progetto: **L/S SA0210**

TITOLO DEL PROGETTO: Studio sulle interazioni ospite-parassita tra *Anisakis* sp. e pesce

Numero identificativo Unità Operativa: 5 (EMS)

Fente di appartenenza dell'Unità Operativa: ASI-5 (Orlando)

Responsabile scientifico dell'U.O.: (cognome) Nardo, (nome) Francesco

VOCI DI SPESA	IMPORTI	DESCRIZIONE
materiali di consumo		
personale a contratto		
missioni		
spese generali (max. 10%)		
(1) TOTALI	0	

Firma del Responsabile Scientifico dell'Unità Operativa

[Handwritten signature]



Firma del Responsabile Scientifico del progetto

[Handwritten signature]