

IDENTIFICAZIONE A LIVELLO DI SPECIE DI LARVE DI Anisakidae MEDIANTE PCR/RFLP

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	PRINCIPIO DEL METODO	2
3	BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI	3
4	DEFINIZIONI	4
5	APPARECCHIATURA DI PROVA	4
6	REATTIVI E MATERIALI	5
7	PROCEDIMENTO	7
	7.1 Preparazione del campione di prova	7
	7.2 Esecuzione della prova	7
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	12
9	CARATTERISTICHE DEL METODO	13
10	MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	14

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento definisce un metodo di prova interno per determinare, mediante PCR/RLFP, la specie di appartenenza di nematodi della famiglia Anisakidae conservati in etanolo. Il metodo può essere applicato a larve o loro parti prelevate da biopsia umana o da tessuti di origine animale.

2 PRINCIPIO DEL METODO

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici specifici dei quali si conoscono la sequenza nucleotidica iniziale e terminale (coppia di oligonucleotidi). Se una specie possiede una porzione di DNA caratteristica, per composizione e/o dimensione, è possibile scegliere una coppia di oligonucleotidi che permetta la sua amplificazione esclusivamente per quella specie. L'amplificazione mediante PCR è caratterizzata da alta sensibilità e specificità.

Alla tecnica di PCR è possibile abbinare la tecnica di "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP), ovvero l'analisi dei frammenti di restrizione. La tecnica permette di distinguere due frammenti di PCR mediante digestione enzimatica con una o più endonucleasi, enzimi in grado di tagliare il DNA a livello di brevi e specifiche sequenze oligonucleotidiche. In questo caso è possibile, con una singola coppia di primer, amplificare la stessa porzione di DNA da specie diverse e distinguerle successivamente in base alle dimensioni dei frammenti di DNA ottenuti dopo digestione enzimatica. I nematodi parassiti della famiglia Anisakidae infettano allo stadio larvale pesci, cefalopodi e gamberi ed allo stadio adulto, pesci, uccelli pescatori e mammiferi marini. Le larve dei generi *Anisakis* e *Pseudoterranova*, sono responsabili, se ingerite dall'uomo, della patologia nota come anisakiasi. Le larve recuperate da pazienti o da ospiti infetti, possono essere identificate morfologicamente come Anisakidae, ma l'identificazione a livello di specie/genere è possibile soltanto utilizzando metodi molecolari. Quelli basati sulla PCR-RFLP hanno permesso di identificare, a livello di specie, singole larve di *Anisakis* spp., *Pseudoterranova* spp., *Contracaecum* spp e *Hysterotilacium* spp. In particolare, 8 specie di *Anisakis*: *A. simplex* sensu-stricto (ss), *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. ziphidarium*, *A. physeteris*, *A. typica*, *Anisakis* sp. A e la specie ibrida *A. simplex/pegreffii* (ref.) e *Pseudoterranova* spp (*P. decipiens* o *P. krabbei* o *P. bulbosa*). Le specie di *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* e *Hysterotilacium* differiscono tra loro per composizione e/o dimensione nella sequenza nucleotidica del locus Internal Transcribed Spacer (ITS), che permette l'identificazione univoca di tutti gli anisakidae epidemiologicamente rilevanti.

In tabella A sono visibili le dimensioni dei frammenti di ITS per le diverse specie di *Anisakis* e *Pseudoterranova* prodotti mediante amplificazione con una coppia di oligonucleotidi specifici (NC2 e NC5). In tabella B sono riportate le dimensioni dei frammenti ottenuti mediante digestione enzimatica dei frammenti ITS, utilizzando gli enzimi di restrizione indicati.

Tabella A - Dimensione dei prodotti di amplificazione della sequenza ITS attesi (in coppie di basi) per ogni specie

A. pegreffii	A. simplex s.s.	A. simplex/pegreffii ibrido	A. simplex C	A. ziphidarium	A. physeteris	A. typica	A. sp.A	<i>Pseudoterranova</i> spp. (<i>P. decipiens</i> s.s.)	<i>Hysterotilacium</i> spp (<i>H. aduncum</i>)	C. rudolphii (A, B, C)	C. osculatum
951	951	951	953	931	898	956	926	906	1031	978	964

Tabella B - Dimensione dei frammenti di digestione attesi (in coppie di basi) e distinguibili mediante elettroforesi con differenti enzimi di restrizione.

Enzimi di restrizione	Frammenti di PCR di ITS	
	<i>Hinfl</i>	<i>HhaI</i>
<i>A. pegreffii</i>	34, 67, 235, 284, 331	419, 532
<i>A. simplex ss</i>	34, 67, 235, 615	419, 532
<i>A. simplex/pegreffii ibrido</i>	34, 67, 235, 284, 331, 615	419, 532
<i>A. simplex C</i>	34, 67, 237, 615	142, 279, 532
<i>A. ziphidarium</i>	34, 273, 292, 332	413, 518
<i>A. physeteris</i>	34, 241, 263, 360	385, 513
<i>A. typica</i>	34, 328, 594	103, 153, 180, 212, 308
<i>A. sp A</i>	34, 269, 288, 335	137, 272, 517
<i>Pseudoterranova s.p.p.</i> (<i>P. decipiens s.s.</i>)	35, 179, 693	413, 493
<i>Hysterotilacium spp</i> (<i>H. aduncum</i>)	348, 683	48, 74, 149, 184, 269, 307
<i>Contracoecum rudolphii</i> (A, B, C)	3, 49, 89, 320, 492	70, 126, 143, 240, 374
<i>Contracoecum osculatum</i>	463-501	212, 375, 377

3 BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI

La Rosa G., D'Amelio S. e Pozio E. (2006) "Molecular Identification of nematode Worms From Seafood (*Anisakis* spp. and *Pseudoterranova* spp.) and Meat (*Trichinella* spp.), in *Food-Borne Pathogens. Methods and Protocols*. Edited by (Adley CC., ed.) Human Press, Totowa, NJ, pp. 217-234

Murrel KD. (2002) Fishborne zoonotic parasites: epidemiology, detection and elimination, in *Safety and Quality Issues in Fish Processing* (Bremmer, HA., ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, pp.114-141.

Zhu XQ, D'Amelio S, Palm HW, Paggi L, George-Nascimento M, Gasser RB. (2002) SSCP-based identification of members within the *Pseudoterranova decipiens* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae) using genetic markers in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Parasitology*. 124, pp. 615-23.

D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanço M, Paggi L. (2000) Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *Int J Parasitol*. 30, pp. 223-226.

Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB. (1998) Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol*. 28, pp. 1911-21.

Kijewska A, Rokicki J, Sitko J, Wegrzyn G. (2002) Ascaridoidea: a simple DNA assay for identification of 11 species infecting marine and freshwater fish, mammals, and fish-eating birds. *Exp Parasitol*. 101, pp.35-39.

Mattiucci S, Nascetti G. (2006) Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite*. 13, pp. 99-113.

Farjallah S, Busi M, Mahjoub MO, Slimane BB, Paggi L, Said K, D'Amelio S. (2008) Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitol Int*. 57, pp.430-6.

UNI EN ISO 22174: 2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali – reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca di microrganismi patogeni negli alimenti – requisiti generali e definizioni.

UNI EN ISO 20837:2006. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti Requisiti per la preparazione del campione per la ricerca qualitativa.

UNI EN ISO 20838:2006. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali Reazione a catena di polimerizzazione (PCR) per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti Requisiti per l'amplificazione e la ricerca per metodi qualitativi.

Reinecke, S.N., Morgan, R.D. (1991) Bfal, a new Mael isoschizomer from *Bacteroides fragilis*, recognizes the sequence 5' C decreases TAG 3'. Nucleic Acids Res. 19, pp. 1152

Ono, A., Matsuo, Y., Matsuda, A., Ueda, T. (1993) Nucleosides and nucleotides. CXIX. Inhibition of DNA-cytosine methylase HhaI by a self-complementary oligonucleotide containing 5-fluorocytosine. Biol. Pharm. Bull. 16, pp. 529-533

Sato, S., Hutchison, C.A. III, Harris, J.I. (1977) A thermostable sequence-specific endonuclease from *Thermus aquaticus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, pp. 542-546

Abollo E, Paggi L, Pascual S, D'Amelio S. (2003) Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. Infect Genet Evol. 3, pp. 175-181.

Mercken E, Van Damme I, Šoba B, Vangeenberghe S, Serradell A, Lumain JPL, De Sterck T, Lalle M, Gabriël S. High occurrence of Anisakidae at retail level in cod (*Gadus morhua*) belly flaps and the impact of extensive candling. Food Waterborne Parasitol. 2020; 22:e00108.

4 DEFINIZIONI

ITS (Internal Transcribed Spacer), sequenza spaziatrice dei geni ribosomali nucleari comprendente l'ITS-1, il gene 5.8S e l'ITS-2 con l'aggiunta di 70 nucleotidi del gene 28S.

Oligonucleotide, breve sequenza (15/30 basi nucleotidiche) utilizzata per amplificare un frammento specifico di DNA.

SetA, miscela di 2 oligonucleotidi che amplificano le sequenze ITS di tutte le specie.

Controllo positivo di estrazione, larva di riferimento, o sue parti, utilizzate nella stessa sessione di lavoro dei campioni di prova per verificare la corretta conduzione del protocollo di estrazione del DNA.

DNA/larva, preparazione di DNA estratto da una singola larva.

Controllo positivo di amplificazione, DNA genomico estratto da larve di riferimento o loro parti, utilizzato nelle sessioni di amplificazione di singole larve per verificare il corretto funzionamento del sistema PCR.

Controllo negativo di amplificazione, acqua grado reagente utilizzata nelle sessioni di amplificazione di singole larve per verificare l'assenza di contaminazioni nella reazione di PCR.

Enzimi di restrizione. Gli enzimi di restrizione sono enzimi di origine batterica che tagliano il DNA in punti specifici, diversi per ciascun enzima, permettendo così di frammentare il DNA in maniera precisa e riproducibile. Gli enzimi di restrizione tagliano sequenze specifiche del DNA, di grandezza variabile da 4 a 8 basi e diverse per ciascun enzima. I tagli che avvengono all'interno della catena sono ad opera delle endonucleasi. La concentrazione degli enzimi si misura in "unità enzimatiche" e, nel caso specifico delle endonucleasi di restrizione, 1 unità (U) corrisponde alla quantità di enzima necessario a digerire completamente 1 µg di DNA.

Inoltre, nel presente documento sono utilizzate le definizioni e la terminologia della norma UNI EN ISO 22174.

5 APPARECCHIATURA DI PROVA

Microscopio stereoscopico, ingrandimenti 60-500 X

Centrifuga da banco per provette da 1,5 mL, 10.000 x g

Congelatore, temperatura $\leq -15^{\circ}\text{C}$

Termoblocco vibrante a temperatura variabile da 25 a 100°C

Magnete con alloggiamento multiplo per provette da 1,5 mL

Termociclatore per PCR

Frigorifero, $1-8^{\circ}\text{C}$

Qiaxcel, sistema di elettroforesi verticale capillare

Le apparecchiature riportate sotto vengono utilizzate solo se l'apparecchiatura Qiaxcel per il sistema di elettroforesi capillare è fuori servizio per un periodo prolungato.

Sistema per elettroforesi orizzontale completo di accessori e alimentatore di corrente

Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g

Transilluminatore UV

Sistema per acquisizione di immagini

Micropipette (1-10 μL , 2-20 μL , 20-100 μL , 50-200 μL e 200-1000 μL)

Sistema di produzione di acqua di grado reagente

Agitatore Vortex

Agitatore orbitale

6 REATTIVI E MATERIALI

6.1 Reattivi e materiali per il protocollo di estrazione A

Ditiotreitolo (DTT), composto chimico reperibile in commercio. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Proteinasi K (PK), enzima proteolitico ad ampio spettro, utilizzato per la digestione e rimozione della componente proteica in protocolli di purificazione degli acidi nucleici. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Conservare PK e DTT e/o loro aliquote in congelatore ($T \leq -15^{\circ}\text{C}$).

Tampone di incubazione IB+, soluzione reperibile in commercio: Tissue and Hair Extraction Kit, Promega. Preparare al momento dell'uso combinando, secondo le specifiche del produttore, il tampone di incubazione, PK 18 mg/mL e DTT 1M, identificare tale soluzione con la sigla "IB+". Conservare il tampone di incubazione in frigorifero ($T 1\div 8^{\circ}\text{C}$).

Tampone di lisi LB+, soluzione reperibile in commercio: DNA IQ™ System kit, Promega. Preparare al momento dell'uso combinando, secondo le specifiche del produttore il tampone di lisi e DTT 1M, identificare tale soluzione con la sigla "LB+". Conservare il tampone di lisi a temperatura ambiente.

Resina paramagnetica, sospensione reperibile in commercio: DNA IQ™ System kit, Promega. Conservare a temperatura ambiente.

Tampone di lavaggio, soluzione reperibile in commercio: DNA IQ™ System kit, Promega. Preparare al momento dell'uso secondo le specifiche del produttore, identificare tale soluzione con la sigla "WB+". Conservare a temperatura ambiente.

Tampone di eluizione, soluzione reperibile in commercio: DNA IQ™ System kit, Promega. Conservare a temperatura ambiente.

6.2 Reattivi e materiali per il protocollo di estrazione B

Tampone fosfato (PBS), KH_2PO_4 0,34 g, Na_2HPO_4 1,21 g, NaCl 8,0 g, acqua distillata e deionizzata fino 1000 mL. Aggiungere i componenti sopra specificati in circa 750 mL di acqua distillata e deionizzata. Mescolare mediante agitatore magnetico fino a completa dissoluzione. Controllare il pH ($7,3\pm 0,2$) e portare a volume. Conservare a temperatura ambiente. Stabilità: 6 mesi.

DTT, Ditiotreitolo, composto chimico reperibile in commercio. Conservare secondo le specifiche del produttore.

PK, Proteinasi k, enzima proteolitico ad ampio spettro, utilizzato per la digestione e rimozione della componente proteica in protocolli di purificazione degli acidi nucleici. Conservare secondo le specifiche del produttore.

RLT, Tampone di lisi Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore

Soluzione di lisi, preparare al momento dell'uso combinando, secondo le specifiche del produttore, 16 µL PK 18 mg/mL, 8 µL DTT 1M e 56 µL PBS.

Sospensione contenente resina paramagnetica ad alta affinità per il DNA, conservare secondo le specifiche del produttore.

Soluzione RLT, preparare al momento dell'uso combinando, secondo le specifiche del produttore, 200 µL RLT e 5 µL di resina paramagnetica.

AW1, Tampone di lavaggio, Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.

RPE, Tampone di lavaggio, Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.

AE, Tampone di eluizione, Qiagen. Conservare secondo le specifiche del produttore.

6.3 Reattivi e materiali per le successive fasi

2xPCR master mix, soluzione reperibile in commercio adatta alla conduzione di esperimenti di amplificazione PCR. Conservare secondo le specifiche del produttore. Nel caso si utilizzi una confezione di grandi dimensioni il prodotto viene aliquotato in volumi da 1-2 mL, mantenere le specifiche di conservazione della confezione di origine.

SetA, Miscela di oligonucleotidi utilizzata per la PCR. La miscela è ottenuta combinando un pari volume degli oligonucleotidi NC5 e NC2 diluiti alla concentrazione di 20 pmoli/µL con acqua grado reagente o Milli-Q. La concentrazione finale di ciascun oligonucleotide corrisponde a 10 pmoli/µL. Aliquote di 100µL vengono preparate e conservate a temperature ≤ -15°C fino a un massimo di 10 anni.

Oligonucleotidi, preparazione commerciale (tabella C). Il prodotto liofilizzato viene ricostituito, secondo le indicazioni del produttore, ad una concentrazione di 100 pmoli/µL con acqua grado reagente o Milli-Q. L'avvenuta ricostituzione viene riportata con data e firma nel rapporto tecnico allegato agli oligonucleotidi dalla ditta produttrice. Conservare il prodotto liofilizzato a temperature ≤ -15°C fino a un massimo di 20 anni. Conservare il prodotto ricostituito a temperature ≤ -15°C fino ad un massimo di 10 anni.

Tabella C - Sequenza degli oligonucleotidi che compongono il setA, relativi codici e sequenze nucleotidiche amplificate.

Sequenza oligonucleotidi	Codice	Sequenza amplificata
5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3'	NC5	ITS
5'-TTAGTTTCTTTTCTCCGCT-3'	NC2	

QIAxcel DNA High Resolution kit, prodotto commerciale della Qiagen per l'uso con il QIAxcel. Include cartucce di separazione e soluzioni per la preparazione e per la corsa dei campioni da analizzare. Conservare i singoli componenti secondo le specifiche del produttore.

Alignment marker 15-600 bp, (Alignment marker with 15 bp and 600 bp fragments). Prodotto commerciale della Qiagen, da usare con il QIAxcel. Conservare secondo le specifiche del produttore

Alignment marker 15-1000 bp, (Alignment marker with 15 bp and 1 kb fragments). Prodotto commerciale della Qiagen, da usare con il QIAxcel. Conservare secondo le specifiche del produttore

DNA size marker, Prodotto commerciale della Qiagen, da usare con il QIAxcel. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Acqua grado reagente o Milli-Q.

Larve di riferimento, singole larve, o porzioni, di Anisakidae caratterizzate a livello di specie/genotipo conservate in etanolo (95-100%). Conservare in congelatore ($T \leq -15^{\circ}\text{C}$) fino ad un massimo di 10 anni.

DNA di riferimento: DNA genomico purificato da larve di riferimento. Conservare in congelatore ($T \leq -15^{\circ}\text{C}$) fino ad un massimo di 10 anni.

Enzimi di restrizione HinfI/ e HhaI: enzimi reperibili in commercio adatti alla conduzione di esperimenti di digestione enzimatica del DNA (per esempio della New England Biolabs, HinfI, cod. R0155L; HhaI, cod. R0139L). Conservare secondo le specifiche del produttore. La sequenza oligonucleotidica specifica riconosciuta da ciascun enzima è riportata in Tabella D.

Tabella D - Sequenza oligonucleotidica specifica riconosciuta da ciascun enzima di restrizione

Enzima di restrizione	Sequenza riconosciuta
HinfI/	5'...G [↓] ANTC...3' 3'...CTNAG...5'
HhaI/	5'...GCGC...3' 3'...CGCG...5'

Tampone di restrizione: Soluzione a pH e concentrazione salina nota, reperibile in commercio, adatta alla conduzione di esperimenti di digestione enzimatica del DNA e venduta unitamente ai rispettivi enzimi di restrizione. Conservare secondo le specifiche del produttore.

I reagenti sotto elencati sono richiesti solo nel caso di utilizzo del gel d'agarosio

Loading buffer, prodotto commerciale che permette di eseguire l'elettroforesi di molecole di DNA; può essere incluso nella soluzione PCR master mix. Conservare secondo le specifiche del produttore.

Agarosio e agarosio ad alta risoluzione, prodotti commerciali definiti adatti alla conduzione di elettroforesi per molecole di DNA. L'agarosio ad alta risoluzione permette la conduzione di elettroforesi per molecole di DNA di dimensioni ridotte (tra 25 e 700 paia di basi), migliorandone la separazione. Conservare a temperatura ambiente fino a un massimo di 24 mesi o, se presenti, secondo le specifiche del produttore.

TAE soluzione 50x, prodotto commerciale (2M Tris-acetato, 50mM EDTA, pH 8,2–8,4 a 25°C). Conservare a temperatura ambiente fino a un massimo di 24 mesi o, se presenti, secondo le specifiche del produttore.

TAE soluzione 1x, preparazione di 1000 mL: prelevare 20 mL dalla soluzione 50x e portare il volume a 1000 mL con acqua distillata. Preparare al momento dell'uso.

Intercalante del DNA, prodotto commerciale in grado di inserirsi nei filamenti di DNA. Utilizzato per visualizzare i prodotti di amplificazione su gel di agarosio. Conservare a temperatura ambiente 5 anni o, se presenti, secondo le specifiche del produttore.

L50, prodotto commerciale contenente molecole marcatrici di peso molecolare per DNA. Viene ritenuto idoneo ogni prodotto commerciale che contenga molecole multiple di 50 bp nel range 50-500 bp. Conservare in frigorifero ($T 1\div 8^{\circ}\text{C}$) secondo le specifiche del produttore.

L1000, prodotto commerciale contenente molecole marcatrici di peso molecolare per DNA. Viene ritenuto idoneo ogni prodotto commerciale che contenga molecole multiple di 250-1000 bp nel range 250-10000 bp. Conservare in frigorifero ($T 1\div 8^{\circ}\text{C}$) secondo le specifiche del produttore.

7 PROCEDIMENTO

7.1 Preparazione del campione di prova

Il campione viene controllato per verificare l'effettiva presenza della/e larva/e o di loro parti e del loro stato di conservazione.

L'etanolo contenente le larve da analizzare viene travasato in una piastra Petri. Il contenuto viene ispezionato al microscopio e le larve presenti, fino ad un massimo di 3, vengono prelevate e trasferite in provette da 1,5 mL. Qualora l'operatore ritenga che le larve, o i frammenti di larva, del campione di prova non siano idonee all'esecuzione del test (ad esempio per la presenza di contaminanti quali muffe), il test non viene eseguito.

L'etanolo in eccesso viene eliminato o lasciato evaporare per ridurre al minimo possibile il volume nel quale è sospesa la larva. Ogni provetta conterrà una sola larva o porzione di larva.

Centrifugare le provette contenenti le larve da analizzare al massimo dei giri per pochi secondi.

Conservare i campioni così preparati in congelatore ($T \leq -15^{\circ}\text{C}$). In tali condizioni le larve possono essere conservate per l'estrazione per 10 anni.

7.2 Esecuzione della prova

L'estrazione del DNA dalla larva da sottoporre a prova può essere effettuata con due protocolli alternativi identificati di seguito come **Protocollo A** o **Protocollo B**.

7.1.1 Estrazione del DNA dalla larva (**Protocollo A**)

Se non diversamente specificato, la procedura viene eseguita a temperatura ambiente.

Ogni sessione di prova prevede che una larva di riferimento venga sottoposta alla procedura di estrazione ed identificata come "controllo positivo di estrazione".

Prima di cominciare la procedura, preparare un volume sufficiente delle soluzioni IB+ e LB+ secondo le raccomandazioni della ditta produttrice dei kit di cui fanno parte.

- a) Centrifugare le provette contenenti le larve da analizzare al massimo dei giri per pochi secondi.
- b) Aggiungere 100 μL di IB+.
- c) Incubare a 55°C per 30-60 minuti in termoblocco. Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- d) Centrifugare come al punto "a".
- e) Aggiungere 200 μL di LB+.
- f) Aggiungere 10 μL di resina paramagnetica dopo averla risospesa mediante agitazione su vortex.
- g) Incubare per 5-10 minuti a 25°C in termoblocco. Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- h) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete e attendere 30-60 secondi che le particelle di resina paramagnetica siano bloccate dal campo magnetico sulla parete della provetta.
- i) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione facendo attenzione a non toccare le particelle di resina.
- j) Aggiungere 100 μL di LB+ e risospesare le particelle di resina mediante agitazione su vortex.
- k) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete come al punto "h".
- l) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione.
- m) Aggiungere 100 μL di WB+ 1x e risospesare le particelle di resina mediante agitazione su vortex.
- n) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete come al punto "h".
- o) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione.
- p) Ripetere la fase di lavaggio (punti da "m" a "o") con WB+ per un totale di 3 volte.
- q) Dopo l'ultimo lavaggio lasciare le provette aperte per asciugare le particelle di resina per 15-20 minuti.
- r) Aggiungere 100 μL di tampone di eluizione e risospesare delicatamente le particelle di resina, non usare il vortex.
- s) Incubare a 65°C nel termoblocco per 5 minuti. Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.

- t) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete come al punto “h”.
- u) Recuperare la fase liquida (90-100 µL circa) e trasferirla in provette da 1,5 mL.
- v) Gli estratti così preparati vengono definiti “DNA/larva” e conservati in congelatore ($T \leq -15^{\circ}\text{C}$). In tali condizioni possono essere conservati anche fino a 10 anni.

7.2.2 Estrazione del DNA dalla larva (**Protocollo B**)

Se non diversamente specificato, la procedura viene eseguita a temperatura ambiente.

Ogni sessione di prova prevede che una larva di riferimento venga sottoposta alla procedura di estrazione ed identificata come “controllo positivo di estrazione”.

Prima di cominciare la procedura, preparare le quantità necessarie della soluzione di lisi e della soluzione RLT.

- a) Centrifugare le provette contenenti le larve da analizzare al massimo dei giri per pochi secondi.
- b) Trasferire una singola larva o frazione nella provetta.
- c) Aggiungere 80 µL di Soluzione di lisi in ogni provetta.
- d) Incubare a 55°C per 30 – 45 minuti in termoblocco. Durante l’incubazione lasciare in agitazione a circa 900 oscillazioni al minuto.
- e) Aggiungere 200 µL di soluzione RTL e 5 µL biglie magnetiche.
- f) Incubare per 3 minuti a temperatura ambiente in termoblocco. Durante l’incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- g) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete e attendere 30-60 secondi che le particelle di resina paramagnetica siano bloccate dal campo magnetico sulla parete della provetta.
- h) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione facendo attenzione a non toccare le particelle di resina.
- i) Aggiungere 100µL di AW1
- j) Incubare 1 minuto a temperatura ambiente in termoblocco a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- k) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione
- l) Aggiungere 100 µL di RPE
- m) Incubare 1 minuto a temperatura ambiente in termoblocco a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- n) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete come al punto “g”.
- o) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione.
- p) Ripetere i passaggi previsti dal punto l al punto o
- q) Aggiungere 80 µL di AE
- r) Incubare 3 minuti a temperatura ambiente in termoblocco a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- s) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete come al punto “g”.
- t) Recuperare la fase liquida (DNA/larva) e trasferirla in nuove provette da 1,5 mL.
- u) Gli estratti così preparati vengono definiti “DNA/larva” e conservati in congelatore ($T \leq -15^{\circ}\text{C}$). In tali condizioni possono essere conservati anche fino a 10 anni.

7.2.3 Amplificazione PCR

Dove non espressamente indicato mantenere le provette in ghiaccio o in supporto refrigerante, utilizzare puntali con barriera e indossare guanti monouso.

Ad ogni sessione è previsto l’utilizzo di un controllo positivo, ovvero DNA di riferimento, e di un controllo negativo, ovvero acqua, per verificare la corretta conduzione della reazione di amplificazione.

La seguente procedura prevede l’utilizzo di una PCR master mix a concentrazione 2x, in caso di concentrazione diversa modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- a) Scongela: DNA/larva, 2x PCR MasterMix, SetA, controllo positivo di amplificazione (DNA di riferimento).
- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da PCR da 0,2 mL.

- c) Preparare un volume adeguato di miscela di amplificazione cumulativa. Calcolare i volumi sulla base della miscela di amplificazione del singolo campione (Tabella E) e del numero totale dei campioni da analizzare aumentato di 2 unità (1 per il controllo positivo e 1 per il controllo negativo di amplificazione).

Tabella E – miscela di amplificazione del singolo campione: componenti e relativi volumi

2x PCR MasterMix (6.6)	25 µL
H ₂ O	22 µL
SetA (6.7)	1 µL
Totale	48 µL

- d) Mescolare la miscela di amplificazione mediante vortex e, se necessario, centrifugare al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 48 µL della miscela di amplificazione cumulativa in ciascuna delle provette da PCR (punto “b”).
- f) Aggiungere in ogni provetta 2 µL di preparazione di DNA/larva da analizzare.
- g) Chiudere le provette, mescolare mediante vortex e centrifugare al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (tabella F) del termociclatore, aspettare che la temperatura raggiunga 95°C e, dopo avere messo in pausa lo strumento, inserire le provette nel blocco termico. Abbassare il coperchio e uscire dalla pausa.

Tabella F – ciclo di amplificazione

Denaturazione iniziale #	15 min/95°C
Amplificazione	30 s/95°C 30 s/50°C 75 s/72°C
Numero di cicli	35
Estensione finale	7 min/72°C

La durata della denaturazione iniziale può variare, seguire le specifiche del produttore della Master Mix

- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- l) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (T 1÷8°C) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.4 Visualizzazione dei risultati

- a) Accendere lo strumento Qiaxcel ed il relativo software di gestione Qiaxcel ScreenGel sul PC collegato.
- b) Accedere al pannello “Process Profile”; indicare alla voce “Cartridge Type” “DNA HighRes”; indicare il profilo e l’Experiment Directory desiderati.
- c) Spostare il carrello delle provette in “posizione di accesso” selezionando la voce “Load Position” dal pannello “Status Information”.
- d) Inserire nella posizione MARKER1 le 12 provette contenenti 10 µL (volume minimo) dell’“Alignment Marker 15-600 bp” e riportare il carrello nella posizione iniziale selezionando la voce “Park Position” dal pannello “Status Information”.
- e) Posizionare i campioni da analizzare (volume minimo 10 µL) per file complete da 12 a partire dalla riga “A”. Qualora i campioni da analizzare non fossero in numero sufficiente a completare la fila da 12, aggiungere un opportuno numero di provette contenenti il QX DNA dilution buffer (volume minimo 10 µL) in dotazione con il QIAxcel DNA High Resolution kit.
- f) Per ogni round di analisi (che può comprendere fino ad un massimo di 8 corse da 12 campioni) includere una provetta contenente il DNA size marker.

- g) In "Run Parameters" impostare alla voce "Method" l'opzione 0M500; selezionare le corse occupate da campioni sulla piastra virtuale nel pannello laterale "Sample Row Selection".
- h) In "Sample Selection" impostare i parametri di corsa come segue:
 - i) "Plate ID": PCR + data "Alignment Marker" 15bp – 600bp. In "Sample Information" inserire i nomi dei campioni nelle caselle corrispondenti.
 - j) In "Run Check" verificare che tutte le righe selezionate siano occupate da provette contenenti prodotti di PCR da analizzare o QX DNA dilution buffer e che il Marker di allineamento sia stato caricato, quindi spuntare le caselle apposite; infine selezionare "Run".
 - k) Visualizzare le corse selezionando la modalità "Absolute migration time" dal menù "Image options" e processare i dati con il comando "Start analysis".
 - l) Scorrere gli elettroferogrammi dei singoli campioni per verificare la presenza di picchi al di sopra della banda più alta del marker di allineamento.
 - m) Stampare il risultato della corsa elettroforetica
 - n) Chiudere il programma e spegnere lo strumento.

Se l'apparecchiatura Qiaxcel per il sistema di elettroforesi capillare è fuori servizio per un periodo prolungato procedere con gel di agarosio seguendo il protocollo di seguito riportato:

- i) Assemblare l'apparato per elettroforesi seguendo le raccomandazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame.
- ii) Pesare 1 g di agarosio e versarlo in 100 mL di TAE 1x preparato in un contenitore di vetro.
- iii) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione.
- iv) Portare la sospensione di agarosio ad ebollizione per circa 30 sec. Se all'ispezione visiva la soluzione non appare omogenea continuare la fase di ebollizione per altri 30 sec.
- v) Reintegrare con acqua il volume perso durante l'ebollizione.
- vi) Lasciare raffreddare la soluzione di agarosio.
- vii) Prima che la soluzione cominci a solidificare aggiungere l'intercalante del DNA.
- viii) Agitare delicatamente per disperdere uniformemente l'intercalante del DNA e versare l'agarosio nel piatto per il gel preparato (punto i) in precedenza.
- ix) Aspettare che il gel solidifichi; non meno di 30 minuti.
- x) Collocare il piatto contenente il gel nel sistema per elettroforesi.
- xi) Coprire il gel con tampone TAE 1x.
- xii) Aggiungere il loading buffer se non presente nella PCR master mix utilizzata, in ogni provetta contenente il prodotto di amplificazione.
- xiii) Mescolare i campioni mediante vortex e centrifugare le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- xiv) Caricare in ogni pozzetto 10 µL del prodotto di amplificazione seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette.
- xv) Caricare il primo e l'ultimo pozzetto con 10 µL della soluzione L1000.
- xvi) Connettere l'apparato per elettroforesi con l'alimentatore e impostare un valore di tensione di 10 V/cm di gel.
- xvii) Lasciare il gel sotto tensione per circa 30 minuti o fino a quando il colorante più veloce contenuto nel loading buffer non raggiunge 1 cm dal bordo del gel.
- xviii) Dopo 30 minuti, controllare sul transilluminatore UV o sistema di acquisizione d'immagine la separazione delle bande. La corsa elettroforetica è ritenuta sufficiente se è possibile distinguere facilmente tutte le bande del marcatore di peso molecolare compreso tra 250 e 2.000 bp. Se la separazione è insufficiente, lasciare il gel sotto tensione fino ad avere una separazione adeguata.
- xix) A corsa conclusa trasferire il gel nel sistema di acquisizione di immagini (5.12) ed effettuare una stampa del risultato

7.2.5 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se:

- i) il controllo positivo di amplificazione mostra un prodotto di amplificazione in accordo con la tabella A;
- ii) il controllo negativo di amplificazione non mostra prodotti di amplificazione o eventualmente solo bande riferibili agli oligonucleotidi inutilizzati e/o a loro derivati (primer dimer);
- iii) il controllo positivo di estrazione produce un prodotto di amplificazione in accordo con la tabella A;
- iv) il campione di prova presenta un prodotto di amplificazione compreso tra 800 e 1000 bp (come riportato in tabella A)

La presenza di prodotti di amplificazione compresi tra 800 e 1000 bp viene ritenuta sufficiente ed adeguata per procedere con la successiva fase del protocollo.

7.2.6 Digestione enzimatica con endonucleasi

Dove non espressamente indicato, le provette sono mantenute in ghiaccio o su supporto refrigerante. Dove non espressamente indicato utilizzare puntali con barriera e indossare guanti monouso.

Ad ogni sessione è prevista la digestione enzimatica, in singolo, con entrambi gli enzimi di restrizione HinfI e HhaI. Inoltre viene utilizzato un controllo positivo, ovvero il prodotto di amplificazione del DNA di riferimento, per verificare la corretta conduzione della reazione di digestione.

La seguente procedura prevede l'utilizzo di enzimi di restrizione concentrati 10-20 U/ μ L e tamponi di digestione concentrati 10x. In caso di concentrazione diversa, modificare il protocollo secondo le specifiche del produttore.

- a) Scongelare i prodotti di PCR, ed il tampone di digestione 10x.
- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da 0,2 mL.
- c) Preparare un volume adeguato di miscela di digestione cumulativa per ciascun enzima di restrizione. Calcolare i volumi sulla base della miscela di digestione del singolo campione (tabella G) e del numero totale dei campioni da analizzare comprensivo del controllo positivo.

Tabella G – Miscela di digestione del singolo campione: componenti e relativi volumi

10x tampone di digestione	1,5 μ L
Enzima di restrizione	5U (0,25-0,5 μ L)
H ₂ O	3-3,25 μ L
Totale	5 μ L

- d) Mescolare ciascuna miscela di digestione mediante vortex e, se necessario, centrifugare al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 5 μ L della miscela di digestione cumulativa in ciascuna delle provette da 0,2 mL (punto "b").
- f) Aggiungere in ogni provetta 10 μ L di prodotto di PCR da analizzare.
- g) Chiudere le provette, mescolare mediante vortex e centrifugare al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Incubare i campioni a 37°C per 2h nel termoblocco senza agitazione.
- i) Finita l'incubazione, centrifugare le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- l) Aggiungere il loading buffer secondo le specifiche del produttore.
- m) Mescolare i campioni mediante vortex e centrifugare le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- n) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (T 1÷8°C) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.7 Visualizzazione dei risultati

- i) Seguire quanto riportato al paragrafo 7.2.4; dal punto a) al punto j) utilizzando come marker l'“Alignment Marker” 15bp – 1000bp.
- ii) Visualizzare le corse selezionando la modalità “Absolute migration time” dal menù “Image options” e processando i dati con il comando “Start analysis”.
- iii) Scorrere gli elettroferogrammi dei singoli campioni ed individuare i picchi relativi ai marker di allineamento.
- iv) Al termine di questa operazione riprocessare i dati con il comando “Start analysis” selezionando l'opzione “Relative migration time”.
- v) Stampare il risultato della corsa elettroforetica
- vi) Chiudere programma e spegnere computer.

Se lo strumento Qiaxcel, sistema di elettroforesi capillare, è fuori servizio per un periodo prolungato procedere con gel di agarosio seguendo il protocollo riportato al paragrafo 7.2.4 dal punto i) al punto xix). Per la preparazione del gel d'agarosio utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame e modificare il punto ii) del paragrafo 7.2.4 utilizzando 3 grammi di agarosio alta risoluzione.

7.2.8 Interpretazione dei risultati della digestione enzimatica

Le dimensioni delle bande di digestione evidenziate dall'elettroforesi vengono valutate per comparazione delle stesse con i pesi molecolari di riferimento del “DNA size marker” o di L50 e con il controllo di digestione.

Il test di amplificazione sarà ritenuto valido se il controllo positivo di digestione mostra un profilo di bande di digestione in accordo con la tabella B.

L'identificazione della specie viene effettuata confrontando le dimensioni dei frammenti prodotti dalle singole digestioni del campione di prova con la tabella B.

Qualora un campione mostri una banda non attesa, l'identificazione a livello di specie non sarà possibile, il risultato della prova verrà espresso come “specie non determinabile”.

8 **ESPRESSIONE DEI RISULTATI**

Esprimere i risultati nel rapporto di prova secondo le seguenti modalità:

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 34, 67, 235, 615bp e con *HhaI* è 419, 532bp, allora il campione è identificato come *A. simplex* ss.

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 34, 67, 235, 284, 331bp e con *HhaI* è 419, 532bp, allora il campione è identificato come *A. pegreffii*.

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 34, 67, 235, 284, 331, 615 e con *HhaI* è 419, 532 allora il campione è identificato come ibrido *A. simplex/pegreffii*

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 34, 67, 237, 615bp e con *HhaI* è 142, 279, 532bp, allora il campione è identificato come *A. simplex* C.

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 34, 273, 292, 332bp e con *HhaI* è 413, 518bp, allora il campione è identificato come *A. ziphidarium*.

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 34, 241, 263, 360bp e con *HhaI* è 385, 513bp, allora il campione è identificato come *A. physeteris*.

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 34, 328, 594bp e con *HhaI* è 103, 153, 180, 212, 308bp, allora il campione è identificato come *A. typica*.

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 34, 269, 288, 335bp e con *HhaI* è 137, 272, 517bp, allora il campione è identificato come *A. sp. A*.

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 35, 179, 693bp e con *HhaI* è 413, 493bp, allora il campione è identificato come *Pseudoterranova spp.*

Se il profilo delle bande di digestione con *HinfI* è 348, 683bp e con *HhaI* è 48, 74, 149, 184, 269,

307bp, allora il campione è identificato come *Hysterotilacium spp.*

Se il profilo delle bande di digestione con HinfI è 3, 49, 89, 320, 492bp e con HhaI è 70, 126, 143, 240, 374bp, allora il campione è identificato come *Contracaecum rudolphii* (A, B, C).

Se il profilo delle bande di digestione con HinfI è 463, 501bp e con HhaI è 212, 375, 377 bp, allora il campione è identificato come *Contracaecum osculatum*.

Qualora il test risulti valido ed il campione analizzato mostri bande di digestione non classificabili tra quelle presenti in tabella B, l'identificazione della specie viene definita non possibile, il risultato della prova verrà espresso come "specie non determinabile".

9 CARATTERISTICHE DEL METODO

Il presente metodo è stato caratterizzato in termini di sensibilità, specificità e ripetibilità. I risultati sono stati utilizzati per confermare che il metodo è adatto allo scopo previsto e sono riportati nel relativo fascicolo di validazione, al quale si rimanda.

10 MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

Il presente metodo di prova può essere eseguito solo da personale autorizzato.

I dispositivi individuali di protezione sono rappresentati da guanti monouso e camice.

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori, sia per la manipolazione che per la gestione dei rifiuti, fare riferimento ai manuali emessi dal *Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro* dell'Istituto, a disposizione del personale dei laboratori e visionabili sul sito: <https://lfintranet.iss.it/web/guest/spp-sistema-di-gestione-della-salute-e-sicurezza>.