



Laboratorio Europeo di Riferimento per i Parassiti

Dipartimento Malattie Infettive
Reparto Parassitosi Alimentari e Neglette

Istituto Superiore di Sanità



RICERCA DI PARASSITI IN FILETTI DI PESCE DOPO DIGESTIONE ARTIFICIALE

INDICE

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2. INTRODUZIONE	2
3. RIFERIMENTI	2
4. APPARECCHIATURE DI PROVA	2
5. REATTIVI E MATERIALI	3
6. PROCEDIMENTO PER ANISAKIDAE	3
7. PROCEDIMENTO PER OPISTORCHIIDAE	4
8. MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE	5

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Scopo della presente Procedura Operativa è quello di fornire un protocollo per la digestione artificiale dei filetti di pesci marini e d'acqua dolce (tessuto muscolare), sia freschi che congelati, al fine di isolare gli stadi larvali di Anisakidae e Opistorchiidae presenti nel tessuto muscolare.

2. INTRODUZIONE

I pesci marini e d'acqua dolce sono ospiti intermedi di alcuni parassiti che possono causare gravi malattie nell'uomo se ingeriti mangiando pesce crudo o poco cotto. Lo stadio larvale di nematodi della famiglia Anisakidae, appartenenti al genere *Anisakis* e *Pseudoterranova*, parassitano un'ampia varietà di pesci marini e cefalopodi e possono causare l'anisakiasi nell'uomo. Lo stadio di metacercaria dei trematodi della famiglia Opistorchiidae (che include le specie *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* e *Opisthorchis felineus*), Heterophyidae and Echinostomatidae, parassitano i pesci d'acqua dolce e possono causare l'opistorchiasi/clonorchiasi nonché altre infezioni da trematodi.

La digestione artificiale è il metodo impiegato per la ricerca di larve di nematodi o metacercarie di trematodi nei filetti di pesce. Questo metodo, mediante la digestione del tessuto muscolare del pesce, permette di raccogliere i parassiti eventualmente presenti e poi di eseguirne: i) l'identificazione morfologica e/o molecolare a livello di specie/genotipo; ii) la coltura *in vitro*; iii) l'infezione in animali da laboratorio.

3. RIFERIMENTI

Reg. (CE) n. 852/2004 of 29/4/2004 e successivi aggiornamenti

Reg. (CE) n.853/2004 of 29/4/2004 e successive aggiornamenti

CODEX STAN 244-2004 Standard for salted Atlantic herring and salted sprat. Joint FAO/WHO Food Standards Programme.

ISO 23036-1:2021 Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 1: UV-press method.

ISO 23036-2:2021 - Microbiology of the food chain — Methods for the detection of Anisakidae L3 larvae in fish and fishery products — Part 2: Artificial digestion method.

4. APPARECCHIATURE DI PROVA

4.1. Termometro 1-100°C;

4.2. bilancia analitica;

4.3. stereo-microscopio con illuminazione dal basso (ingrandimento 15-20X);

- 4.4. frullatore con lame sottili;
- 4.5. agitatore magnetico con piatto scaldante;
- 4.6. setaccio di acciaio inossidabile, con maglie di circa 500 μm (per Opistorchiidae) o 180-500 μm (per Anisakidae);
- 4.7. provette o cilindri tarati (50 o 100 ml in plastica o vetro);
- 4.8. beaker in vetro;
- 4.9. imbuto separatore conico in vetro;
- 4.10. pipette (1, 10 e 25 ml);
- 4.11. forbici o bisturi;
- 4.12. ancoretta magnetica rivestita di teflon;
- 4.13. Armadio termostato (30-50°C), opzionale (vedi paragrafo 6.5).

5. REATTIVI E MATERIALI

- 5.1 Acqua corrente;
- 5.2 acido cloridrico;
- 5.3 pepsina in polvere 1: 10,000 NF (US National Formulary) corrispondente a 1: 12,500 BP (British Pharmacopea) e a 2,000 FIP (Fédération Internationale de Pharmacie) o pepsina liquida 660 EP (European Pharmacopoeia) unità/ml;
- 5.4 etanolo 90%.

6. PROCEDIMENTO PER ANISAKIDAE

Se il materiale di partenza è costituito da filetti di pesce, iniziare dal punto 6.2.

- 6.1 Spellare ed eviscerare il pesce, raccogliere il tessuto muscolare;
- 6.2 ispezionare visivamente il campione per verificare l'eventuale presenza di larve di Anisakidae, raccoglierle ed esaminarle sotto lo stereo-microscopio per l'identificazione morfologica;
- 6.3 aggiungere ad un beaker di vetro, in sequenza: un volume appropriato di acqua corrente pre-riscaldata a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, acido cloridrico e pepsina secondo la Tabella 1;

Tabella 1. Preparazione della soluzione di digestione

Filetto di pesce	Acqua	HCl 25% o 37%	Pepsina in polvere (liquida)*
25-200 g	2L	Se 25%: 16 ml \pm 0,5 Se 37%: 10.8 ml \pm 0,5	10 g \pm 0.2 (o 30 ml, se liquida)

***1g di pepsina in polvere = 3ml di pepsina liquida**

- 6.4 sminuzzare il filetto di pesce con le forbici o il coltello;
- 6.5 trasferire il tessuto sminuzzato nel beaker, aggiungere la soluzione di digestione (incluso la soluzione rimasta se è stato usato il frullatore) e aggiungere la barretta magnetica;
- 6.6 posizionare il beaker sull'agitatore magnetico e impostare la piastra scaldante a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ (non eccedere i 40°C), coprire il beaker di vetro con un foglio di alluminio per mantenere la temperatura costante, diminuire l'evaporazione ed evitare schizzi. In alternativa, e se disponibile, l'agitatore magnetico senza riscaldamento può essere posizionato in armadio termostato (4.13) impostato a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ (non eccedere i 40°C).
- 6.7 mantenere la soluzione sull'agitatore fino a scomparsa del tessuto (circa 15 - 30 min, la durata della digestione deve essere regolata in base alla consistenza del tessuto); ma non eccedere i 45 min di digestione.
- 6.8 spegnere l'agitatore, pesare il setaccio, filtrare la soluzione di digestione attraverso il setaccio nel beaker, facendo attenzione che non trabocchi, e pesare di nuovo il setaccio con il materiale digerito;

NOTA: la digestione è considerata soddisfacente se il residuo presente sul setaccio (tessuto non digerito) corrisponde a non più del 5% del peso del campione prima della digestione.

- 6.9 raccogliere le larve di Anisakidae eventualmente presenti sul setaccio, ed esaminarle sotto lo stereo-microscopio per l'identificazione morfologica.

Le larve possono essere trasferite in una provetta riempita con etanolo 90% e conservate a temperature comprese tra -20°C e 10°C fino a 5 anni.

7. PROCEDIMENTO PER OPISTORCHIIDAE

Se il materiale di partenza è costituito da filetti di pesce, iniziare dal punto 7.2.

- 7.1. Spellare ed eviscerare il pesce, raccogliere il tessuto muscolare;
- 7.2. aggiungere ad un beaker di vetro, in sequenza: un volume appropriato di acqua di rubinetto pre-riscaldata a $40-42^{\circ}\text{C}$, acido cloridrico e pepsina secondo la Tabella 2.

Tabella 2. Preparazione della soluzione di digestione

Filetto di pesce	Acqua	HCl 25% o 37%	Pepsina in polvere (liquida)*
100g	2L	Se 25% usare $10 \text{ ml} \pm 0,5$ Se 37% usare $6.8 \text{ ml} \pm 0,5$	$10 \pm 0.2 \text{ g}$ (30 ml)

***1g pepsina in polvere = 3ml di pepsina liquida**

- 7.3. sminuzzare il filetto di pesce con le forbici o il coltello e omogenarlo nel frullatore per 5 secondi aggiungendo un piccolo volume della soluzione di digestione;
- 7.4. trasferire il tessuto sminuzzato nel beaker, aggiungere la soluzione di digestione rimasta e aggiungere la barretta magnetica;
- 7.5. posizionare il beaker sull'agitatore magnetico e impostare la piastra scaldante a 40-42°C, coprire il beaker di vetro con un foglio di alluminio per mantenere la temperatura costante, diminuire l'evaporazione ed evitare schizzi. In alternativa, e se disponibile, l'agitatore magnetico senza riscaldamento può essere posizionato in armadio termostato (4.13) impostato a 42°C ± 2.
- 7.6. mantenere la soluzione sull'agitatore fino a scomparsa del tessuto (circa 15-20 min, la durata della digestione deve essere regolata in base alla consistenza del tessuto);
- 7.7. spegnere l'agitatore e filtrare la soluzione di digestione attraverso il setaccio nell'imbuto di sedimentazione, facendo attenzione che non trabocchi;
- 7.8. lasciare sedimentare la soluzione per 30 minuti, aprire il rubinetto per raccogliere 40 ml della soluzione in una provetta da centrifuga o in un cilindro di vetro tarato;
- 7.9. lasciare sedimentare la soluzione nella provetta/cilindro per almeno 5 minuti, poi aspirare il soprannatante fino a 10 ml;
- 7.10. versare i 10 ml rimasti in una capsula Petri e analizzare il sedimento allo stereomicroscopio a 15-20X ingrandimenti per rilevare l'eventuale presenza di metacercarie di Opisthorchiidae.

Le metacercarie possono essere trasferite in una provetta riempita con etanolo 90% e conservate a temperature comprese tra -20°C e 10°C fino a 5 anni.

8. MISURE DI SICUREZZA DA OSSERVARE

Il personale di laboratorio che effettua la procedura, deve indossare dispositivi individuali di protezione costituiti da guanti monouso, camice e mascherina. L'uso di pepsina liquida riduce il rischio di reazione allergiche nel personale di laboratorio.

Per il comportamento generale da adottare da parte degli operatori fare riferimento ai manuali emessi dal *Servizio di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro* dell'Istituto, a disposizione del personale dei laboratori e anche visionabili sul sito www.iss.it/inet/spsl/index (*Manuale per gli operatori che lavorano nei laboratori a carattere chimico e biologico; Manuale operativo per la gestione dei rifiuti prodotti all'interno dell'ISS*).