

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	5
6	REATTIVI E MATERIALI	5
7	PROCEDIMENTO	7
	7.1 <i>Preparazione del campione di prova</i>	7
	7.2 <i>Esecuzione della prova</i>	8
8	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	13
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 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., *Contracoecum* spp e *Hysterothylacium* 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. krabbrei* o *P. bulbosa*). Le specie di *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracoecum* e *Hysterothylacium* differiscono tra loro per composizione e/o dimensione nella sequenza nucleotidica del locus 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

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

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

Enzimi di restrizione	Frammenti di PCR di ITS	
	<i>Hinfl</i>	<i>Hhal</i>
<i>A. pegreffii</i>	34, 67, 235, 284, 331	419, 532
<i>A. simplex</i> ss	34, 67, 235, 615	419, 532
<i>A. simplex/pegreffii</i> ibrido	34, 67, 235, 284, 331, 615	419, 532
<i>A. simplex</i> C	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</i> s.p.p. (<i>P. decipiens</i> s.s.)	35, 179, 693	413, 493
<i>Hysterotilacium</i> spp (<i>H. aduncum</i>)	348, 683	48, 74, 149, 184, 269, 307
<i>Contraecaecum rudolphii</i> (A, B, C)	3, 49, 89, 320, 492	70, 126, 143, 240, 374

Utilizzando la tecnica PCR/RFLP, è possibile distinguere, sulla base delle dimensioni dei frammenti di digestione della sequenza ITS ottenuti con l'enzima *Hinfl*, larve del genere *Anisakis* da quelle del genere *Pseudoterranova*, *Contraecaecum* e *Hysterotilacium* e, all'interno del genere *Anisakis*, larve di *A. pegreffii*, *A. simplex/pegreffii* genotipo ibrido, *A. ziphidarium*, *A. physeteris*, *A. typica* e *A. shupakovi* da quelle di *A. simplex* C ed *A. simplex* sensu-stricto. Mediante digestione della sequenza ITS con l'enzima *Hhal* è possibile distinguere larve di *A. simplex* C da larve di *A. simplex* s.s.

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, Mathiopoulou 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.

ISO/FDI 20837:2006(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for sample preparation for qualitative detection

ISO/FDI 20838:2006(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens - Requirements for amplification and detection for qualitative methods

Promega Technical Bulletin, Part# TB307 Rev 5/06. Tissue and hair extraction kit (for use with DNA IQ™) Protocol. Instruction for use of product DC6740

Promega Technical Bulletin, Part# TB297 Rev 4/06. DNA IQ™ system – Database Protocol. Instruction for use of products DC6700 and DC6701

Reinecke, S.N., Morgan, R.D. (1991) Bfal, a new *MaeI* 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.

4 DEFINIZIONI

ITS (Internal Transcribed Sequence), sequenza spaziatrice dei geni ribosomali nucleari comprende l'ITS-1, il gene 5.8S, 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.

Larve di riferimento, larve di *Anisakis pegreffii* in etanolo, fornite dal Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "G. Sanarelli", Università Sapienza, Roma

DNA di riferimento, DNA genomico purificato da larve di riferimento, fornito dal Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "G. Sanarelli", Università Sapienza, Roma

Controllo positivo di estrazione, larva di riferimento o sue parti, trattate nella stessa sessione di lavoro dei campioni in esame 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. È utilizzato nelle sessioni di amplificazione di singole larve per verificare il corretto funzionamento del sistema PCR

Controllo negativo di amplificazione, acqua grado reagente. È utilizzato nelle sessioni di amplificazione di singole larve per verificare il corretto funzionamento del sistema 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

- 5.1 Microscopio stereoscopico, ingrandimenti 60-500 X
- 5.2 Centrifuga refrigerata da banco per provette da 1,5 mL, 10.000 x g
- 5.3 Congelatore, temperatura ≤ -15°C
- 5.4 Termoblocco vibrante a temperatura variabile da 25 a 100°C
- 5.5 Magnete con alloggiamento multiplo per provette da 1,5 mL
- 5.6 Termociclatore per PCR
- 5.7 Frigorifero, 1 - 8°C
- 5.8 Sistema per elettroforesi orizzontale completo di accessori e alimentatore di corrente
- 5.9 Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g
- 5.10 Transilluminatore UV
- 5.11 Sistema per acquisizione di immagini
- 5.12 Micropipette (1-10 µL, 2-20 µL, 20-100 µL, 50-200 µL e 200-1000 µL)
- 5.13 Sistema di produzione di acqua di grado analitico (18M Ω/cm)
- 5.14 Agitatore Vortex
- 5.15 Agitatore orbitale

6 REATTIVI E MATERIALI

- 6.1 **Tampone di incubazione**. Soluzione reperibile in commercio: Tissue and Hair Extraction Kit, Promega, codice DC6740. Preparare al momento dell'uso combinando, secondo le specifiche del produttore, alcuni componenti del kit: incubation buffer, PK 18 mg/mL e DTT 1M, identificare tale soluzione con la sigla "IB+". Conservare i componenti del kit e/o le aliquote derivate in congelatore a -20°C per PK e DTT e, in frigorifero a 4°C per l'incubation buffer.
- 6.2 **Tampone di lisi**. Soluzione reperibile in commercio: DNA IQ™ System kit, Promega, codice DC6700 o DC6701. Preparare al momento dell'uso combinando, secondo le specifiche del produttore, alcuni componenti del kit: lysis buffer (DNA IQ™ System kit, Promega) e DTT 1M (Tissue and Hair Extraction Kit, Promega), identificare tale soluzione con la sigla "LB+". Conservare i componenti del kit e/o le aliquote derivate a -20°C per DTT

e, a temperatura ambiente per il lysis buffer.

- 6.3 Resina paramagnetica.** Sospensione reperibile in commercio: DNA IQ™ System kit, Promega, codice DC6700 o DC6701. Conservare a temperatura ambiente.
- 6.4 Tampone di lavaggio.** Soluzione reperibile in commercio: DNA IQ™ System kit, Promega, codice DC6700 o DC6701. Preparare al momento dell'uso secondo le specifiche del produttore, identificare tale soluzione con la sigla "WB+". Conservare a temperatura ambiente.
- 6.5 Tampone di eluizione.** Soluzione reperibile in commercio: DNA IQ™ System kit, Promega, codice DC6700 o DC6701. Conservare a temperatura ambiente.
- 6.6 2x PCR master mix.** Soluzione reperibile in commercio adatta alla conduzione di esperimenti di amplificazione PCR (per esempio: Promega, cod. M7501 o M7113). 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, e vengono mantenute le specifiche di conservazione della confezione di origine.
- 6.7 SetA.** Miscela di oligonucleotidi (6.8) utilizzata per la PCR. La miscela è ottenuta combinando un pari volume degli oligonucleotidi NC5 e d NC2 (6.8) più 3 volumi di TE 0.1x (6.17). La concentrazione finale corrisponde a 20 pmoli/μL. Aliquote di 100 μL vengono preparate e conservate in congelatore (5.3) fino a un massimo di 10 anni.
- 6.8 Oligonucleotidi.** Preparazione commerciale (tabella C). Il prodotto liofilizzato viene ricostituito, secondo le indicazioni del produttore, ad una concentrazione di 100 pmoli/μL con TE 0,1x. L'avvenuta ricostituzione viene riportata con data e firma nel rapporto tecnico allegato agli oligonucleotidi dalla ditta produttrice. Conservare il prodotto liofilizzato in congelatore (5.3) fino a un massimo di 5 anni. Conservare il prodotto ricostituito in congelatore (5.3) fino ad un massimo di 10 anni.

Tabella C - Sequenza degli oligonucleotidi che compongono il setA (6.7 e 6.8), relativi codici e sequenze nucleotidiche amplificate.

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

- 6.9 Loading buffer 6x,** prodotto commerciale che permette di eseguire l'elettroforesi di molecole di DNA; può essere incluso nella soluzione PCR master mix di cui al punto 6.6. Conservare secondo le specifiche del produttore.
- 6.10 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.
- 6.11 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.
- 6.12 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.
- 6.13 Bromuro di etidio soluzione,** prodotto commerciale 10 mg/L. Soluzione di lavoro: diluire 1:100.000 (per 100 mL di soluzione aggiungere 1 μL). Conservare a temperatura ambiente in bottiglia protetta dalla luce fino a un massimo di 24 mesi.

NOTA: Il bromuro di etidio è potenzialmente mutageno, carcinogeno e teratogenico, trattare con cautela tutte le soluzioni che contengono questa sostanza indossando guanti monouso.

- 6.14 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 (5.7) secondo le specifiche del produttore.
- 6.15 L1000**, prodotto commerciale contenente molecole marcatrici di peso molecolare per DNA. Viene ritenuto idoneo ogni prodotto commerciale che contenga molecole multiple di 250-1.000 bp nel range 250-10.000 bp. Conservare in frigorifero (5.7) secondo le specifiche del produttore.
- 6.16 TE soluzione 1x**, prodotto commerciale 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA-Na₂, pH 7.6–8.1 a 25°C. Conservare in frigorifero (5.7) fino a un massimo di 24 mesi.
- 6.17 TE soluzione 0.1x**, soluzione TE 1x diluita. Preparazione di 10 mL: prelevare 1 mL della soluzione 1x e aggiungere 9 mL di acqua distillata. Sterilizzare usando filtri 0,22 µm. Preparare al momento dell'uso.
- 6.18 Acqua grado reagente o Milli-Q**, resistività ≥ 18 MΩ/cm
- 6.19 Larve di riferimento**, singole larve di *Anisakis pegreffii* o porzioni larvali conservate in etanolo (95-100%). Sono fornite dal Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "G. Sanarelli", Università Sapienza, Roma, in seguito ad isolamento dalla cavità celomatica di pesci naturalmente infetti. Conservare in congelatore (5.3) fino ad un massimo di 10 anni.
- 6.20 DNA di riferimento**: DNA genomico purificato da larve di *A. pegreffii* (1ng/µL), fornito dal Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica "G. Sanarelli", Università Sapienza, Roma. Conservare in congelatore (5.3) fino ad un massimo di 10 anni.
- 6.21 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'

- 6.22 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.

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. Qualora l'operatore non trovi larve all'interno del contenitore il test non viene eseguito.

L'etanolo contenente le larve da analizzare viene travasato in una piastra Petri. Il contenuto viene ispezionato al microscopio (5.1) 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 (5.2) le provette contenenti le larve da analizzare al massimo dei giri per pochi secondi.

Conservare i campioni così preparati in congelatore (5.3). In tali condizioni le larve possono essere conservate per l'estrazione per 10 anni.

7.2 Esecuzione della prova

7.2.1 Estrazione del DNA dalla larva da sottoporre al test

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+ (6.1) e LB+ (6.2) secondo le raccomandazioni della ditta produttrice dei kit di cui fanno parte.

- a) Centrifugare (5.2) le provette contenenti le larve da analizzare al massimo dei giri per pochi secondi.
- b) Aggiungere 100 µL di IB+ (6.1).
- c) Incubare a 55°C per 30-60 minuti in termoblocco (5.4). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- d) Centrifugare come al punto "a".
- e) Aggiungere 200 µL di LB+ (6.2).
- f) Aggiungere 10 µL di resina paramagnetica (6.3) dopo averla risospesa mediante agitazione su vortex.
- g) Incubare per 5-10 minuti a 25°C in termoblocco (5.4). Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- h) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete (5.5) 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+ (6.2) e risospendere le particelle di resina mediante agitazione su vortex.
- k) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete (5.5) come al punto "h".
- l) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione.
- m) Aggiungere 100 µL di WB+ 1x (6.4) e risospendere le particelle di resina mediante agitazione su vortex.
- n) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete (5.5) come al punto "h".
- o) Eliminare la fase liquida mediante aspirazione.
- p) Ripetere la fase di lavaggio (punti da "m" a "o") con WB+ (6.4) 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 (6.5) e risospendere delicatamente le particelle di resina, non usare il vortex.

- s) Incubare a 65°C (5.4) per 5 minuti. Durante l'incubazione lasciare in agitazione a circa 1400 oscillazioni al minuto.
- t) Collocare le provette negli alloggiamenti del magnete (5.5) 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 (5.3). In tali condizioni possono essere conservati anche fino a 10 anni.

7.2.2 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 (6.20), e di un controllo negativo, ovvero acqua (6.18), 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) Scongelare: DNA/larva, 2x PCR MasterMix (6.6), SetA (6.7) controllo positivo di amplificazione (DNA di riferimento 6.20).
- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da PCR da 0,2 µL.
- 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 (5.2) al massimo dei giri per pochi secondi.
- e) Trasferire 20 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 (5.2) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Avviare il ciclo di amplificazione (tabella F) del termociclatore (5.6), 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	2 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

- i) Finita la fase di amplificazione centrifugare (5.2) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- l) Aggiungere 5 µL di loading buffer 6x (6.9) se non presente nella PCR master mix utilizzata.
- m) Mescolare i campioni mediante vortex e centrifugare (5.2) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- n) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.7) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.3 Visualizzazione dei risultati

- a) Assemblare l'apparato per elettroforesi (5.8) seguendo le raccomandazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame.
- b) Pesare (5.9) 1 g di agarosio (6.10) e versarlo in 100 mL di TAE 1x (6.12) preparato in un contenitore di vetro.
- c) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione.
- d) 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.
- e) Reintegrare con acqua il volume perso durante l'ebollizione.
- f) Lasciare raffreddare la soluzione di agarosio.
- g) Prima che la soluzione cominci a solidificare aggiungere 1 µL di soluzione di bromuro di etidio (6.13).
- h) Agitare delicatamente per disperdere uniformemente il bromuro di etidio e versare l'agarosio nel piatto per il gel preparato (punto a) in precedenza.
- i) Aspettare che il gel solidifichi; non meno di 30 minuti.
- j) Collocare il piatto contenente il gel nel sistema per elettroforesi.
- k) Coprire il gel con tampone TAE 1x (6.12).
- l) Caricare in ogni pozzetto 10 µL del prodotto di amplificazione (punto 7.2.2"i") seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette (punto 7.2.2"b").
- m) Caricare il primo e l'ultimo pozzetto con 10 µL della soluzione L1000 (6.15).
- n) Connettere l'apparato per elettroforesi con l'alimentatore e impostare un valore di tensione di 10 V/cm di gel.
- o) Lasciare il gel sotto tensione per circa 30 minuti o fino a quando il colorante più veloce contenuto nel loading buffer (6.9) non raggiunge 1 cm dal bordo del gel.
- p) Dopo 30 minuti, controllare sul transilluminatore UV (5.10) o sistema di acquisizione d'immagine (5.11) la separazione delle bande. La corsa elettroforetica è ritenuta sufficiente se è possibile distinguere facilmente tutte le bande del marcatore di pesi molecolari compresi tra 250 e 2.000 bp. Se la separazione è insufficiente, lasciare il gel sotto tensione fino ad avere

una separazione adeguata.

- q) A corsa conclusa trasferire il gel nel sistema di acquisizione di immagini (5.11) ed effettuare una stampa del risultato.

7.2.4 Interpretazione dei risultati dell'amplificazione PCR

Le dimensioni delle bande di amplificazione evidenziate dall'elettroforesi vengono valutate per comparazione delle stesse (vedi tabella A) con i pesi molecolari di riferimento L1000 (6.15) e con i controlli positivi di estrazione e amplificazione. La valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

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;

L'identificazione della specie viene effettuata in seguito a digestione enzimatica delle bande prodotte comparata con le dimensioni attese e riportate in tabella B.

Qualora un campione mostri una banda non attesa, la successiva digestione enzimatica per l'identificazione a livello di specie non sarà possibile.

7.2.5 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 (6.21). Inoltre viene utilizzato un controllo positivo, ovvero il prodotto di amplificazione del DNA di riferimento (6.20), 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) Scongellare i prodotti di PCR, ed il tampone di digestione 10x (6.22).
- b) Marcare con un numero progressivo una quantità adeguata di provette da 1,5 μ L.
- 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 (6.23)	1,5 μ L
Enzima di restrizione (6.22)	5U (0,25-0,5 μ L)
Prodotti di PCR	10 μ L
H ₂ O	3-3,25 μ L
Totale	15 μ L

- d) Mescolare ciascuna miscela di digestione mediante vortex e, se necessario, centrifugare (5.2)

al massimo dei giri per pochi secondi.

- e) Trasferire 5 μ L della miscela di digestione cumulativa in ciascuna delle provette da 1,5 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 (5.2) al massimo dei giri per pochi secondi.
- h) Incubare i campioni a 37°C per 2h nel termoblocco (5.4) senza agitazione.
- i) Finita l'incubazione, centrifugare (5.2) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- l) Aggiungere 3 μ L di loading buffer 6x (6.9).
- m) Mescolare i campioni mediante vortex e centrifugare (5.2) le provette al massimo dei giri per pochi secondi.
- n) Lasciare le provette in ghiaccio o in frigorifero (5.7) fino al momento dell'elettroforesi.

7.2.6 Visualizzazione dei risultati

- a) Assemblare l'apparato per elettroforesi (5.8) seguendo le raccomandazioni della ditta produttrice. Nella preparazione del gel utilizzare un pettine adeguato al numero di campioni in esame.
- b) Pesare (5.9) 3 grammi di agarosio alta risoluzione (6.10) e versarli in 100 mL di TAE 1x (6.12) preparati in un contenitore di vetro.
- c) Risospendere delicatamente la polvere mediante rotazione e lasciare riposare in frigorifero a 4°C per 30 min.
- d) 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.
- e) Reintegrare con acqua il volume perso durante l'ebollizione.
- f) Lasciare raffreddare la soluzione di agarosio.
- g) Versare l'agarosio nel piatto per il gel preparato (punto a) in precedenza.
- h) Aspettare che il gel solidifichi per non meno di 30 minuti.
- i) Collocare il piatto contenente il gel nel sistema per elettroforesi.
- j) Coprire il gel con tampone TAE 1x (6.12).
- k) Caricare in ogni pozzetto il prodotto di digestione enzimatica (punto 7.2.5 "n") seguendo il numero progressivo di marcatura delle provette (punto 7.2.5 "b").
- l) Caricare il primo e l'ultimo pozzetto con 10 μ L della soluzione L50 (6.14).
- m) Connettere l'apparato per elettroforesi con l'alimentatore e impostare un valore di tensione di 2,5-10 V/cm di gel.
- n) Lasciare il gel sotto tensione per circa 30 minuti o fino a quando il colorante più veloce contenuto nel loading buffer (6.9) non raggiunge 1 cm dal bordo del gel.
- o) Colorare il DNA immergendo il gel in 400 ml di H₂O contenente 4 μ l di soluzione di bromuro di etidio (6.13) e porre delicatamente in agitazione su agitatore orbitante (5.15).
- p) Dopo 30 minuti, rimuovere la soluzione di colorazione, aggiungere 400 ml di H₂O e porre delicatamente in agitazione su agitatore orbitante (5.15) per 15 min. Ripetere l'operazione una seconda volta.
- q) Controllare sul transilluminatore UV (5.10) la separazione delle bande. La corsa elettroforetica è ritenuta sufficiente se è possibile distinguere facilmente tutte le bande del marcatore di pesi molecolari compresi tra 25 e 1000 bp. Se la separazione è insufficiente, lasciare il gel sotto

tensione fino ad avere una separazione adeguata

- r) A corsa conclusa trasferire il gel nel sistema di acquisizione di immagini (5.11) ed effettuare una stampa del risultato.

7.2.7 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 L50 (6.14) e con il controllo di digestione. Considerato che le differenze tra le specie sono macroscopiche (vedi tabella A) la valutazione visiva viene ritenuta sufficiente ed adeguata.

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.

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. pegreffi*.

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).

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 "impossibile".

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 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 <http://intranet.iss.it/prev/index.php?lang=1&anno=2020&tipo=13> (*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*).