

P2.4 - STRUMENTI INNOVATIVI PER LA VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI ALLERGIE DA PARASSITI ZOONOTICI NELL'UOMO [S. MATTIUCCI]

Borsista FILAS: da reclutare entro marzo 2017.

1. Valutazione nell'uomo dell'ipersensibilità-IgE specifica vs *A. pegreffii*: analisi comparativa di due tests diagnostici, ImmunoCAP (iCAP) ed immunoblotting (WB) nell' "allergia" da Anisakis

Sono stati analizzati 110 sieri umani provenienti da: i) pazienti con anisakiasi gastroallergica (GAA); ii) pazienti con vari sintomi allergici, quali orticaria cronica, dopo il consumo di pesce (CU+); e iii) controlli negativi (pazienti sani, non consumatori di pesce crudo, e non allergici). Antigeni escretori/secretori (ESP) sono stati ottenuti da colture in vitro di larve di *A. pegreffii* che sono stati testati, in WB, verso i sieri dei suddetti pazienti. Risultati: 13 pazienti risultavano IgE-WB positivi agli allergeni indicati come Ani p 1, Ani p 7, mentre 15 di essi soltanto verso Ani p 7. Inoltre, 4 sieri di pazienti del gruppo GAA e 13 di pazienti del gruppo CU+, tra quelli risultati positivi per Ani p 1 e/o Ani p 7, mostrano l'attivazione anche di una banda che corrisponderebbe all'antigene, recentemente definito come un "major allergen", qui indicato come Ani p 13. Gli stessi sieri sono stati testati, in parallelo, anche con il metodo comunemente in uso per diagnosticare allergia- IgE verso Anisakis. I risultati ottenuti mostrano che: 68 dei 110 sieri testati mediante iCAP risultavano positivi (valore $p4>0.35\text{KUA/L}$), ma solo 28 di stessi erano IgE positivi medianate WB. I due metodi mostravano corrispondenza del 63,7 %. La specificità dei due test è intorno al 51,22% per l'iCAP, mentre risulta pari al 100% nel WB. L'incongruenza riscontrata tra i due metodi potrebbe essere dovuta ad una cross-reattività dovuta ad antigeni considerati panallergeni (tropomiosina e paramiosina), che danno una falsa positività all'iCAP, oppure ad uno stato atopico dei pazienti che potrebbero avere, tra il pool di IgE polyclonali, alcune IgE specifiche per *A. pegreffii*.

2. Analisi e caratterizzazione degli antigeni considerati "major allergens" nella specie zoonotica *A. pegreffii*, in funzione della temperatura

Si è proceduto ad analizzare e caratterizzare quegli antigeni considerati come "major allergens" (Daschner et al., (2012) Trends Parasitol. 28:9–15) nella specie zoonotica *A. pegreffii* (Mattiucci et al., 2013. Em. Inf Dis. 19: 496-499), in funzione della temperatura. Questa specie è la più diffusa in specie ittiche di interesse commerciale pescate nei mari italiani. A tal fine, sono stati condotti studi in vitro di larve di *A. pegreffii* mantenute in terreno bifasico con parte solida costituita da soft-agar, e mantenute alle temperature di 7°C (t media conservazione materiale ittico in frigo domestico), 23°C (t media ospite eterotermo) e 37°C+ CO2 (t media ospite accidentale, uomo), per 24h e 48h. Tali temperature sono state scelte in quanto è stato osservato che "in vivo" le larve di *A. pegreffii* mostrano una migrazione, "post-mortem" del pesce, che è temperatura dipendente; infatti la percentuale delle larve in grado di migrare dalle parti viscerali ai filetti, aumenta in modo statisticamente significativo all'aumentare di questo parametro fisico (Cipriani et al., 2016, Food Control, 59 148-157). Gli esperimenti condotti hanno finora mostrato che 20% delle larve messe in coltura a 37°C+CO2 penetrava il gel dopo 24h, e tale percentuale non variava nelle ore successive. Inoltre, gli antigeni/allergeni presenti nei prodotti escretori/secretori (ESPs) (in particolare, Anip 1, Ani p7 ed Ani p13) da larve mantenute in vitro, a 37°C, dopo 24h, mostravano reazione verso anticorpi IgE in WB utilizzando sieri di pazienti risultati positivi per anisakiasi da *A. pegreffii*. In particolare, è stata rilevata la presenza di quegli antigeni definiti come "major allergens" (Ani p 7 e Ani p13) a 24h a 37°C+CO2; infine, a 48h, veniva rilavata anche la presenza nei ESP dell'antigene Ani p1. Parallelamente, veniva valutata la variazione dell'espressione genica mediante qRT-PCR, di Ani p 1 e Ani p 7, in quelle larve mantenute a quelle condizioni di tempo e temperatura. Un aumento significativo dell'espressione dell'mRNA di Ani p 1 veniva osservato dopo 48h, sia a 23°C che a 37°C+CO2; ciò indicherebbe Ani p 1 come possibile biomarker di sensibilità alle variazioni di temperatura.

Attività previste per il II°anno:

- Valutazione dell'espressione genica e di produzione di altri antigeni/allergeni da *A. pegreffii* in funzione della temperatura;
- Analizzare la presenza di proteasi negli ESPs mediante zimografia su gel di polyacrylamide utilizzando diversi substrati, al fine di individuare un loro possibile ruolo nei meccanismi di invasività/patogenicità esplicati dalle forme larvali di *A. pegreffii* nei suoi ospiti naturali ed accidentali;
- Rilevare nei tessuti dei loro ospiti naturali (pesci) infestati da *Anisakis* spp., quegli allergeni specifici responsabili nell'uomo dell' ipersensibilità IgE mediata.