Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

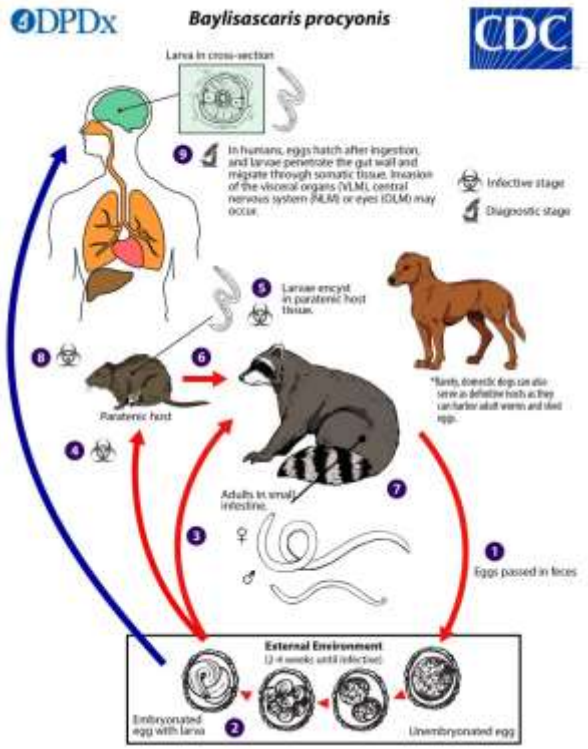
CRAB
Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza

Baylisascaris procyonis: approcci biomolecolari per la conferma diagnostica

Manuela Iurescia, biologo, ricercatore sanitario

Laboratorio di Riferimento Nazionale (NRL-AR) e Centro di Referenza Nazionale per l'antibioticoresistenza (CRN-AR)
UOC Diagnostica Generale
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri"

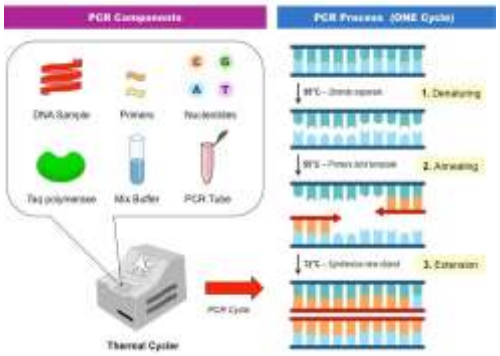
Baylisascaris procyonis: controllo e prevenzione di una rara zoonosi
Webinar 12 dicembre 2022



Le metodiche di biologia molecolare permettono di individuare sequenze specifiche del DNA e quindi di identificare la specie del parassita. Ciò avviene a partire sia da feci (contenenti uova infettanti) che da adulti.

La fase più importante è l'estrazione degli acidi nucleici.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica ampiamente consolidata e impiegata in modo efficiente per classificare i nematodi.

Sia la PCR che il sequenziamento di particolari regioni dell'DNA ribosomiale (rDNA) o del DNA mitocondriale (mtDNA) sono di grande aiuto nell'identificazione.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

J. Parasitol., 91(3), 2005, pp. 716–719

Fatal *Baylisascaris* Larva Migrans in a Colony of Japanese Macaques Kept by a Safari-Style Zoo in Japan

Hiroshi Sato, Yumi Une*, Shigehisa Kawakami†, Eriko Saito†, Haruo Kamiya, Nobuaki Akao‡, and Hidefumi Furuoka§, Department of Parasitology, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki 036-8562, Japan; *Laboratory of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara 229-8501, Japan; †Research Center for Zoo Animals, Gunma Safari World, Tomioka 370-2321, Japan; ‡Section of Environmental Parasitology, Graduate School of Tokyo Medical and Dental University, Tokyo 113-8519, Japan; §Department of Pathobiological Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080-8555, Japan. *e-mail: sato7dp4@cc.hirosaki-u.ac.jp*

Ampliconi ottenuti diversi per lunghezza
Sanger Sequencing = *B. transfuga/B. procionis*

Primer name
28S rDNA
Bp28S-F1
Bp28S-F2
Bp28S-R1
COI mtDNA
BpCoxI-F1
BpCoxI-R1
COII mtDNA
BpCoxII-F1
BpCoxII-F2
BpCoxII-R1

geni codificanti per la *citocromo ossidasi* subunità I e II (Target mitocondriali)★

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

J. Parasitol., 95(3), 2009, pp. 571–577

PCR ASSAYS FOR DETECTION OF *BAYLISASCARIS PROCYONIS* EGGS AND LARVAE

Sriveny Dangoudoubiyam, Ramesh Vemulapalli, and Kevin R. Kazacos
Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907. *e-mail: dsriveny@purdue.edu*

ABSTRACT: The objective of this study was to develop polymerase chain reaction (PCR) assays for detection of *Baylisascaris procyonis* eggs and larvae in fecal, environmental, and tissue samples. We have optimized conventional and real-time PCR assays for *B. procyonis* using the mitochondrial cytochrome oxidase 2 gene as the target for amplification. The lower limit of detection of the parasite genomic DNA was 10 pg in the conventional PCR and 100 fg in the real-time PCR. In both PCR assays, specific amplification of a 146 bp product was achieved with DNA extracted from a single in vitro hatched *B. procyonis* larva and also from canine fecal samples spiked with as few as 20 unembryonated *B. procyonis* eggs per gram of feces. The PCR assays were successfully used for detection of *B. procyonis* eggs and larvae in fecal, environmental, and tissue samples. No DNA amplification was seen when the genomic DNA of related ascarids (including *B. transfuga*) and a hookworm was used as template in the PCR; however, amplification was seen with the very closely related *B. columnaris*.

PCR gene citocromo ossidasi II

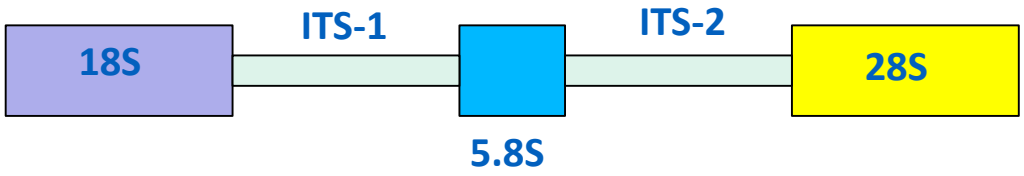
Bassa sensibilità → **Real Time PCR gene *COI II***

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

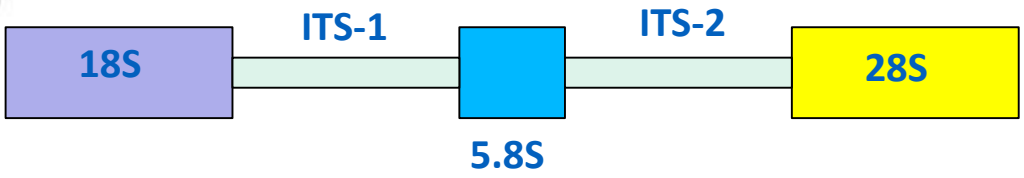
Il DNA ribosomiale (rDNA)

è l'insieme di sequenze di DNA trascritto in RNA ribosomiale (rRNA).
Codifica per le tre componenti strutturali dell'rRNA (18S, 5.8S, 28S) presenti nei ribosomi di tutti gli eucarioti.
I geni dell'rDNA si presentano in sequenze ripetute ed il numero di copie varia a seconda dell'organismo

Inoltre vi è uno spazio di trascrizione interna (Internal Transcribed Spacer – ITS) che prende il nome di ITS-1 e di ITS-2



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



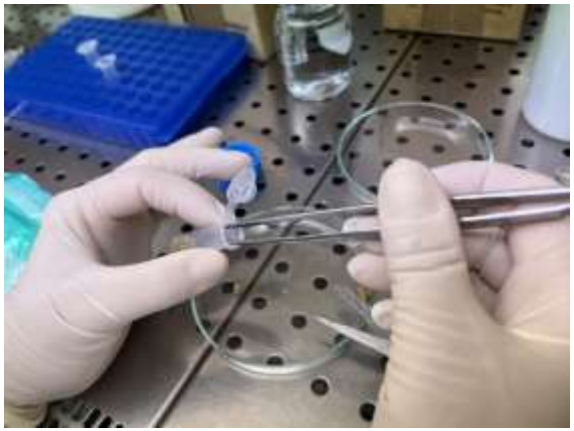
Le regioni ITS hanno un alto grado di variabilità intra ed interspecifica

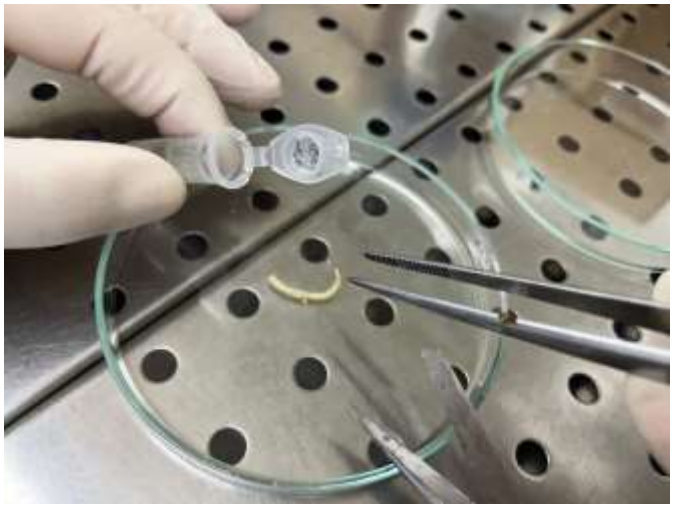
Mentre le regioni 5.8S, 18S e 28S sono altamente conservate le regioni ITS-1 e ITS-2 (non codificanti) sono soggette ad elevata variabilità di sequenza. ★

Questa variabilità rende particolarmente interessante lo studio e la caratterizzazione molecolare di queste regioni per la differenziazione di specie di parassiti

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Il nostro studio





- **piccole porzioni (un cm circa) di parassita sono state sottoposte a lisi completa in un buffer contenente proteinasi K**

- **La lisi avviene in termomixer a 56°C per 2-3 ore**

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

L'estrazione del DNA totale è stata ottenuta utilizzando un kit commerciale (Dneasy Blood & Tissue, Qiagen), seguendo il protocollo del produttore.

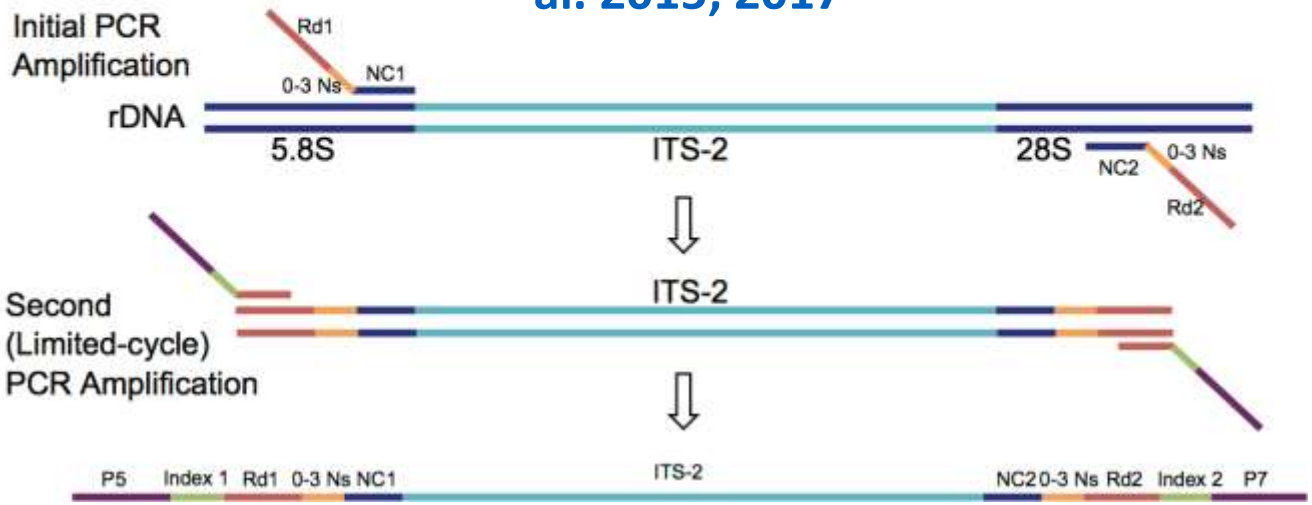
La qualità e la quantità del DNA viene misurata tramite spettrometria (Nanodrop) e fluorimetria (Qubit)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Amplificazione della regione ITS-2 ★

Primers NC1 e NC2 con adattatori Illumina

riportati su *Nemabiome* website* e precedentemente descritti da Avramenko et al. 2015; 2017

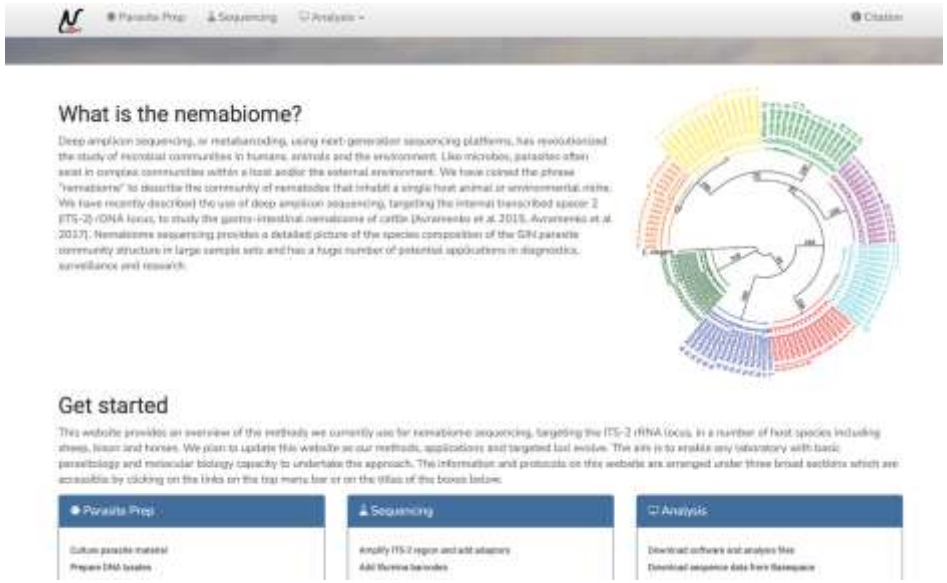


*con modifiche

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

NemaBiome

(https://www.nemabiome.ca/)



Cos'è? Il sequenziamento profondo dell'amplicone, o *metabarcoding*, utilizzando piattaforme di nuova generazione, ha rivoluzionato lo studio delle comunità microbiche nell'uomo, negli animali e nell'ambiente. Come i microbi, i parassiti spesso esistono in comunità complesse all'interno di un ospite e/o dell'ambiente esterno. Abbiamo coniato la frase *"nemabiome"* per descrivere la comunità di nematodi che abitano un singolo animale ospite o nicchia ambientale.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

NGS Amplicon Sequencing

- **Amplicon sequencing su piattaforma Illumina (MiSeq)**

- **Le raw reads vengono “pulite” utilizzando il software *Cutadapt* che trova e rimuove le sequenze degli adattatori, primers ed altre sequenze indesiderate**

Le raw reads così ottenute vengono analizzate con una pipeline customizzata che utilizza *DADA2 e R*

L'amplicone ottenuto (340 bp) viene confrontato mediante allineamento BLAST con le sequenze depositate su vari database (es: GenBank, Nemabiome database)

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Lombardo et al. Parasites & Vectors (2022) 15:24
https://doi.org/10.1186/s13071-021-05116-3

Parasites & Vectors

SHORT REPORT Open Access

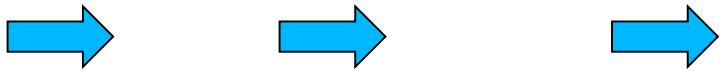
First report of the zoonotic nematode *Baylisascaris procyonis* in non-native raccoons (*Procyon lotor*) from Italy

Andrea Lombardo[1], Giuseppina Brocherel[1], Carla Donnini[1], Gianluca Fichi[2], Alessia Mariacher[2*], Elena Lavinia Diaconu[3], Virginia Carfora[3], Antonio Battisti[3], Nadia Cappai[4], Luca Mattioli[5] and Claudio De Liberato[3]

Abstract

Baylisascaris procyonis is a nematode parasite of the raccoon (*Procyon lotor*), and it can be responsible for a severe form of *larva migrans* in humans. This parasite has been reported from many countries all over the world, after transloca-

Le sequenze ottenute hanno il 100% di coverage e di identità con una sequenza di *Baylisascaris procionis* depositata in GenBank.



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CRAB

Centro di Referenza Nazionale per l'Antibioticoresistenza

www.inaturalist.org da Pixabay

Grazie per l'attenzione!