

Streszczenie

Zoonotyczne nicienie z rodziny Anisakidae, a zwłaszcza należący do tej rodziny *Anisakis simplex* występują powszechnie w wielu gatunkach ryb morskich o znaczeniu gospodarczym. W przypadku larw L3 *A. simplex* zanieczyszczających przetworzone produkty rybne czynnikiem patogennym dla ludzi są alergeny *Anisakis*. Termostabilne alergeny *A. simplex* nawet poddane obróbce cieplnej stosowanej w procesach technologicznych (np. sterylizacja cieplna) mogą powodować reakcje nadwrażliwości u uczulonych konsumentów.

W związku z potrzebą wdrożenia przez KLR ds. anisakiozy badań przetworzonych produktów rybnych w kierunku obecności nicieni z rodzaju *Anisakis* i ich białek konieczne stało się wprowadzenie nowych metod badawczych. Ze względu na brak metod komercyjnych odpowiednich do badania tego typu produktów głównym celem pracy doktorskiej było opracowanie i wdrożenie do stosowania czulej metody do wykrywania antygenów larw L3 *A. simplex* w przetworzonych produktach rybnych. Cel ten zrealizowano w czterech kolejnych zadaniach, których wyniki przedstawiono w pięciu publikacjach.

Zadanie pierwsze polegało na przeprowadzeniu przeglądu literatury naukowej w zakresie wykorzystania różnych technik badawczych do wykrywania larw L3 *A. simplex* w rybach i produktach rybnych. Etap ten był niezbędny przed przystąpieniem do badań doświadczalnych. Analiza literatury przedstawiona w artykule przeglądowym (praca A1) pozwoliła określić, iż najwłaściwszą dla KLR ds. anisakiozy techniką pozwalającą na wykrywanie larw *A. simplex* i ich białek w przetworzonych produktach rybnych są metody immunoenzymatyczne. Ze względu na brak komercyjnych metod immunoenzymatycznych zdecydowano podjąć badania zmierzające do ich opracowania.

W zadaniu drugim biorąc pod uwagę, iż wiedza na temat antygenów nicieni z rodziny Anisakidae jest niezwykle fragmentaryczna przeprowadzono badania w celu ich dokładniejszego scharakteryzowania. Ze względu na obszerność zagadnienia analizę antygenów Anisakidae przedstawiono w trzech pracach doświadczalnych: B1, B2 oraz B3.

W pracy B1 wykonano porównanie przydatności antygenów larw L3 *A. simplex*, *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatum* oraz alergenów rekombinowanych Ani s 1 i Ani s 7 do serologicznej diagnostyki anisakidozy ludzi za pomocą testów IgG-ELISA. Test IgG-ELISA z zastosowanym antygenem wydalniczo-wydzielniczym *C. osculatum* okazał się mieć najwyższą wartość diagnostyczną w serologicznym rozpoznawaniu anisakidozy. Test ten miał najkorzystniejszy stosunek czułości (100%) i specyficzności (89%). Rekcje niespecyficzne obserwowano jedynie

z niektórymi surowicami pacjentów dotkniętych toksokarozą, rzadziej askariozą oraz filariozą.

W pracy B2 przeprowadzono porównawczą analizę profili proteomicznych antygenów *A. simplex*, *P. decipiens* oraz *C. osculatum* stosując metody LC-MS/MS, analizę bioinformatyczną, SDS-PAGE oraz Western Blot. Zidentyfikowano 645 białek antygeny *A. simplex*, 397 białek antygeny *P. decipiens* oraz 261 białek antygeny *C. osculatum*. Wykryto 51 białek wspólnych dla trzech antygenów Anisakidae. Określono względną zawartość zidentyfikowanych białek, przyporządkowano im adnotacje GO, zidentyfikowano wśród nich enzymy wraz z szlakami metabolicznymi, w których biorą udział. W antygenie *A. simplex* zidentyfikowano 14 następujących alergenów: Ani s 1, Ani s 2 (2 izomery), Ani s 3 (2 izomery), Ani s 4, Ani s 8, Ani s 9, Ani s 10, Ani s 11-like, Ani s 13, Ani s FBPP, Ani s PEPB, Thu a 3.0101. Osiem alergenów wykryto w antygenie *P. decipiens*: Ani s 2, Ani s 3 (2 izomery), Ani s 5, Ani s 8, Ani s 9, Ani s PEPB, Ani s Troponin. W antygenie *C. osculatum* zidentyfikowano 4 alergeny: Ani s 2, Ani s 5, Ani s 13, and Asc l 3. Ponadto wykryto 28 prawdopodobnych alergenów w antygenie *A. simplex* i taką samą liczbę przypuszczalnych alergenów w antygenie *P. decipiens*. W antygenie *C. osculatum* zidentyfikowano 25 prawdopodobnych alergenów.

Celem pracy B3 była proteomiczna analiza peptydów/białek, a zwłaszcza alergenów i potencjalnych alergenów zidentyfikowanych w antygenie *A. simplex* poddanym autoklawowaniu (121°C/60 min). Podobnie jak w pracy B2 zastosowano metody LC-MS/MS, SDS-PAGE, Western Blot oraz narzędzia bioinformatyczne. Uzyskane profile SDS-PAGE oraz Western Blot potwierdziły znaczną termostabilność antygeny *A. simplex*. W autoklawowanym antygenie *A. simplex* zidentyfikowano 470 białek. Wykonano analizę względnej zawartości wykrytych białek oraz na podstawie przyporządkowanych adnotacji GO określono lokalizację białek w komórce. W autoklawowanym antygenie *A. simplex* zidentyfikowano peptydy pochodzące z alergenów Ani s 1, Ani s 2, Ani s 3, Ani s 4, Ani s 5 oraz 13 potencjalnych alergenów. W sekwencji wykrytych peptydów pochodzących z alergenów zidentyfikowano lub wyznaczono *in silico* epitopy dla komórek T, komórek B oraz cząsteczek MHC II. Utworzone struktury 3D cząsteczek alergenów i potencjalnych alergenów uwiaryściły strukturalne podobieństwo alergenów należących do tych samych klas oraz między potencjalnymi alergenami i ich alergenami homologicznymi.

Po scharakteryzowaniu antygenów Anisakidae kolejnym zadaniem będącym głównym celem pracy doktorskiej było opracowanie i walidacja immunoenzymatycznej metody wykrywania antygenów *A. simplex* w przetworzonych produktach rybnych. Badania te zostały przedstawione w pracy B4. W ramach tych badań opracowano dwa chemiluminescencyjne testy – CL-S-ELISA oraz CL-C-ELISA. Zoptymalizowano również

przygotowanie próbki produktu do badania testami CL-ELISA. Badania walidacyjne wykazały brak niespecyficzných reakcji z tkankami mięśniowymi różnych gatunków ryb, produktami rybnymi o różnym stopniu przetworzenia oraz dodatkami takimi jak sos pomidorowy, czy olej słonecznikowy. Granica wykrywalności testu CL-S-ELISA (0,5 ng/ml) była dziesięciokrotnie lepsza niż testu CL-C-ELISA (5 ng/mL). Precyzja testu CL-S-ELISA (precyzja wewnątrz testowa: 1,5-4,3%; precyzja zewnątrz testowa: 2,7-7,7%) również była lepsza w porównaniu do testu CL-C-ELISA (precyzja wewnątrz testowa: 5,1-7,5%; precyzja zewnątrz testowa 6,2-13,5%). Skuteczność diagnostyczna testu CL-S-ELISA była istotnie statystycznie lepsza niż metody CL-C-ELISA. Ponadto w przeciwieństwie do komercyjnego testu real-time PCR oba testy CL-ELISA były zdolne do wykrycia obecności *A. simplex* w autoklawowanych konserwach rybných wzbogaconých larwami *Anisakis*.

Ostatnim zadaniem pracy doktorskiej (przedstawionym w pracy B4) była ocena występowania antygenów *Anisakis* w produktach rybných dostępnych w sprzedaży na terenie Polski. Badaniu za pomocą opracowanego wcześniej testu CL-S-ELISA poddano 259 popularnych produktów zawierających ryby i kałamarnice. Ze wszystkich badanych próbek w 72 stwierdzono obecność antygeny *A. simplex*. Większość z nich stanowiły próbki wędzonych produktów z makreli (n = 9), śledzia (n = 16), dorsza (n = 6) oraz morszczuka (n = 8). Pozostałe próbki w których wykryto obecność antygeny to marynowane śledzie (n = 8), konserwy z wątróbki z dorsza (n = 8), konserwy z makreli (n = 10), paluszki surimi (n = 7). Natomiast obecności antygeny *A. simplex* nie wykryto w produktach z sardeli, sardynek, szprot, srebrzyków wielkich, tuńczyka, oraz kałamarnic.

Podsumowując wykazano, że proteomy nie tylko *A. simplex* ale także *P. decipiens* i *C. osculatum* zawierają alergeny oraz potencjalne alergeny. Co więcej, badanie antygeny *A. simplex* potwierdziło, iż jest on niezwykle odporny na działanie wysokiej temperatury. Nawet autoklawowanie w 121°C przez 60 min nie powoduje w nim degradacji wielu peptydów alergenów (oraz ich epitopów). Badania dotyczące opracowania nowych metod immunoenzymatycznych wykazały, że test CL-S-ELISA jest niezwykle efektywny do wykrywania antygeny *A. simplex* w przetworzonych produktach rybných, w tym także w sterylizowanych konserwach. Dlatego test CL-S-ELISA został wdrożony do badania tego typu produktów w KLR ds. anisakiozy. Badanie produktów rybných dostępnych w sprzedaży na terenie Polski, przeprowadzone za pomocą testu CL-S-ELISA pozwala stwierdzić, że około 30% tych produktów może zawierać antygeny *A. simplex* i stanowi potencjalne zagrożenie dla uczulonych konsumentów.

Dodatkowym, praktycznym efektem pracy jest wykazanie dużej przydatności testu IgG-ELISA opartego o zastosowanie antygeny wydalniczo-wydzielniczego

C. osculatum do diagnostyki anisakidozy ludzi. Test ten jest już rutynowo stosowany do badania serologicznego pacjentów w Instytucie Parazytologii w Bernie.

Abstract

Zoonotic nematodes belonging to the Anisakidae family, particularly *Anisakis simplex*, are commonly found in many species of economically viable marine fish. *Anisakis* allergens are a pathogenicity factor of *A. simplex* L3 larvae, which contaminate processed fish products. Thermostable allergens of *A. simplex*, even when subjected to heat treatment applied in technological processes (e.g. heat sterilization), may cause hypersensitivity reactions in sensitized consumers.

As testing of processed fish products for the presence of *Anisakis* nematodes and their proteins is required by the NRL for anisakiasis, new testing methods had to be developed. Since there are no commercial methods available, which would be suitable for testing such products, the main aim of this study was to develop and implement a sensitive method for the detection of *A. simplex* antigens in processed fish products. The said goal was achieved in four subsequent tasks, and the results were presented in five papers.

The first task was to review scientific literature regarding the use of different detection methods for *A. simplex* L3 larvae in fish and fish products. This stage was necessary prior to the onset of experimental investigations. Analysis of literature presented in the review article (paper A1) allowed to determine that enzyme immunoassays are the most appropriate technique for the NRL for anisakiasis to detect *A. simplex* larvae and their proteins in processed fish products. As commercial enzyme immunoassays are not available, it was decided to develop such methods.

Considering that the knowledge of Anisakidae antigens is highly fragmented, further studies were conducted in the second task to characterize them. Because of a complex nature of this issue, the analysis of Anisakidae antigens was detailed in three research papers as follows: B1, B2, and B3.

B1 paper compares the usefulness of antigens of *A. simplex*, *Pseudoterranova decipiens*, *Contracaecum osculatum*, and recombinant allergens Ani s 1 and Ani s 7 for serological diagnosis of human anisakidosis using IgG-ELISA. The IgG-ELISA test with excretory-secretory antigen of *C. osculatum* exhibited the highest diagnostic value in serological diagnosis of anisakidosis. This assay showed the most favorable ratio of sensitivity (100%) and specificity (89%). Nonspecific reactions were observed only with the sera of patients suffering from toxocarosis and, less frequently, ascariasis and filariasis.

A comparative analysis of the proteomic profiles of *A. simplex*, *P. decipiens*, and *C. osculatum* antigens was conducted in the B2 paper using LC-MS/MS, bioinformatics, SDS-PAGE, and Western Blot analyses. Six hundred forty-five proteins

of *A. simplex* antigen, 397 proteins of *P. decipiens* antigen, and 261 proteins of *C. osculatum* antigen were identified. Fifty-one proteins common for the three Anisakidae antigens were detected. Estimation of the relative abundance, assignment of GO annotations, and identification of enzymes with metabolic pathways in which they participate were performed for the detected proteins. In *A. simplex* antigen, there were the following 14 allergens identified: Ani s 1, Ani s 2 (2 isomers), Ani s 3 (2 isomers), Ani s 4, Ani s 8, Ani s 9, Ani s 10, Ani s 11-like, Ani s 13, Ani s FBPP, Ani s PEPB, and Thu a 3.0101. The following 8 allergens were detected in *P. decipiens* antigen: Ani s 2, Ani s 3 (2 isomers), Ani s 5, Ani s 8, Ani s 9, Ani s PEPB, and Ani s troponin. In *C. osculatum* antigen, the following 4 allergens were identified: Ani s 2, Ani s 5, Ani s 13, and Asc l 3. Furthermore, 28 probable allergens were detected in *A. simplex* and *P. decipiens*, whereas in *C. osculatum*, 25 probable allergens were identified.

The B3 paper focused on a proteomic investigation of peptides/proteins, in particular, allergens and potential allergens identified in the autoclaved (121°C/60 min) *A. simplex* antigen. Similarly to the B2 paper, LC-MS/MS, SDS-PAGE, Western Blot and bioinformatics tools were used in this study. Obtained SDS-PAGE and Western Blot profiles confirmed high thermostability of the *A. simplex* antigen. Four hundred and seventy proteins were identified in the autoclaved *A. simplex* antigen. An analysis of the relative abundance of the detected proteins and determination of the localization of proteins in a cell, based on the assigned GO annotations, were performed. In an autoclaved *A. simplex* antigen, peptides were identified, which derived from the following allergens: Ani s 1, Ani s 2, Ani s 3, Ani s 4, Ani s 5, and 13 potential allergens were also identified there. In the sequence of the detected allergen-derived peptides, T-cell, B-cells, and MHC II molecules epitopes were identified or determined in silico. Modelled 3D structures of the allergens and potential allergens revealed structural similarity of allergens belonging to the same classes and between potential allergens and their homologous allergens.

Once Anisakidae antigens were characterized, the next task, which was the main purpose of this doctoral dissertation, was to develop and validate an immunoenzymatic method for the detection of *A. simplex* antigens in processed fish products. These investigations are presented in B4 paper. The study led to the development of two chemiluminescence assays - CL-S-ELISA and CL-C-ELISA. The preparation of a sample of a fish product for examination using the CL-ELISA methods was also optimized. Validation stage with the use of muscle tissues of different fish species, differently processed fish products, and products with addition of tomato sauce or sunflower oil showed no non-specific reactions. The limit of detection of CL-S-ELISA (0.5 ng/ml) was ten times better than that of CL-C-ELISA (5 ng/mL). CL-S-ELISA

showed better precision (intra-assay variations: 1.5-4.3%; inter-assay variations 2.7-7.7%) compared to CL-C-ELISA (intra-assay variations: 5.1-7.5%; inter-assay variations: 6.2-13.5%). The diagnostic performance of CL-S-ELISA was significantly statistically better than that of CL-C-ELISA. Furthermore, in contrast to the commercial real-time PCR assay, both CL-ELISA methods were able to detect *A. simplex* larvae in autoclaved canned fish products enriched with *Anisakis* larvae.

The last task of the doctoral dissertation (presented in B4 paper) was to assess the presence of *Anisakis* antigens in fish products available on the Polish market. Two hundred and fifty-nine popular products containing fish and squid were examined using previously developed CL-S-ELISA method. Of all the tested samples, 72 contained *A. simplex* antigen. Most of them were samples of smoked mackerel (n = 9), herring (n = 16), cod (n = 6) and hake (n = 8) products. Other samples containing antigen included marinated herring (n = 8), canned cod liver (n = 8), canned mackerel (n = 10), and surimi (n = 7). *A. simplex* antigen was not detected in anchovies, sardines, sprat, Atlantic argentine, tuna, and squid products.

In conclusion, it was shown that not only *A. simplex* but also *P. decipiens* and *C. osculatum* proteomes contain allergens and potential allergens. Furthermore, the investigation of the *A. simplex* antigen confirmed that it is extremely resistant to high temperatures. Despite autoclaving at 121°C for 60 minutes, many allergen peptides (and their epitopes) did not degrade. Research on the development of new immunoenzymatic assays showed that the CL-S-ELISA method is highly effective in detecting an antigen of *A. simplex* in processed fish products, including sterilized canned food. Therefore, the CL-S-ELISA method was introduced for testing this type of product at the NRL for anisakiasis. Examinations performed with CL-S-ELISA method on fish products available on the Polish market showed that c.a. 30% of these products may contain *A. simplex* antigen and pose a potential risk for sensitized consumers.

An additional, practical effect of this research is that the IgG-ELISA method, based on the use of the *C. osculatum* excretory-secretory antigen for the diagnosis of human anisakidosis, was demonstrated to be highly useful. This method is already routinely used for serological examination of patients at the Bern Institute of Parasitology.