Universidad Cardenal Herrera-CEU
CEU Escuela Internacional de Doctorado
(CEINDO)

PROGRAMA en CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD

Occurrence, molecular identification, and *in vitro* features of emerging zoonotic parasites in Mediterranean marine fish

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Samantha Moratal Martínez

Dirigida por:
Dra. María Auxiliadora Dea Ayuela
Dr. Jordi López Ramon

VALÈNCIA
2023

TESIS DOCTORAL

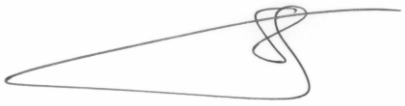
Samantha Moratal Martínez

2023

Los abajo firmantes, como directores de esta Tesis Doctoral realizada por la doctoranda Dña. Samantha Moratal Martínez y titulada "**Occurrence, molecular identification, and *in vitro* features of emerging zoonotic parasites in Mediterranean marine fish**", hacen constar que reúne los requisitos necesarios para su defensa y aprobación y, por tanto, para optar al grado de doctor con mención internacional.

V^{o}B^{o} de los directores de tesis

Dra. María Auxiliadora Dea Ayuela **Dr. Jordi López Ramon**



Esta tesis doctoral ha sido posible gracias a:

La concesión de un contrato predoctoral de la Universidad Cardenal Herrera-CEU (FPI CEU-UCH, 2019-2023) y de una ayuda de movilidad internacional de la CEU Escuela Internacional de Doctorado (CEINDO) y el Banco Santander (disfrutada en 2022).

Los proyectos "Evaluación de la transmisión de parasitismo entre especies de peces cultivados y salvajes - PARAPEZ 2" (2019/1476) y "Evaluación de la transmisión de formas parasitarias entre peces salvajes y cultivados - PARAPEZ 3" (2020/792), cofinanciados por la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del Programa Pleamar, y el Fondo Europeo Marítimo y de Pesca (FEMP); y la financiación recibida de la Universidad Cardenal Herrera-CEU (INDI20/11, INDI21/09, INDI21/12, INDI22/09, INDI22/13).

A la meua família, a totes i tots els qui han estat, estan i estaran, a mi mateixa i a la Mediterrània

ACKNOWLEDGEMENTS

AGRAÏMENTS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Cardenal Herrera-CEU y al, hasta hace poco, Vicerrector de Investigación, el Dr. Ignacio Pérez, por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis doctoral en el CEU y por concederme un contrato predoctoral para estos cuatro años.

Vull donar les gràcies a Jesús Cardells, amb qui va començar tot. En aquella cridada abans de l'estiu de 2019, em proposares, juntament amb Jordi López, tornar al grup i emprendre aquesta tesi. Gràcies per l'oportunitat i la confiança en mi per dur a terme aquest projecte. I gràcies també per introduir-me ja en la carrera en el món de la parasitologia i la fauna silvestre.

A Jordi López, el meu director en aquests anys. Gràcies per fer-me part dels projectes PARAPEZ des del començament, per confiar plenament en mi, tant en les meues idees com en la meua capacitat, i per fer sempre tot el que ha estat en les teues mans per aconseguir que aquesta tesi continuara endavant. Realitzar la tesi en parasitologia i vinculada al medi marí ha sigut una sort. Moltes gràcies per tot.

A Mª Auxiliadora Dea, Maruxi. Llegaste a ser mi directora casi de casualidad, y no puedo estar más contenta y agradecida, porqué sin ti yo no habría podido llegar al final de esta tesis. Siento haberte dado un sustito cuando me rompí el peroné (lo que me ha valido una prohibición de practicar deportes de riesgo durante el resto del doctorado, quién dice de riesgo, dice senderismo, jeje). Espero que estes orgullosa del trabajo que hemos hecho. Te voy a echar de menos, ojalá te hubiese tocado ese ansiado euromillones y hubieses montado un mega laboratorio. Gracias de corazón.

Tornant a PARAPEZ, vull donar les gràcies a tot el personal de les granges, per la seua inestimable col·laboració en els projectes i, sobretot, en les jornades de mostreig, i a totes i tots els que vau participar d'una manera o altra. En especial, moltíssimes gràcies a Silvia i Naima, amb qui començí aquesta aventura. Gràcies per tots els moments de laboratori, de pesca, de Canàries... Gràcies per ajudar-me tant. El mostreig d'aquesta tesi no haguera sigut possible sense vosaltres. Després cadascuna va decidir emprendre un camí diferent, però altra vegada vaig tindre

molta sort, i arribaren Candela i Elena. Xiques, moltíssimes gràcies per haver estat ahí, espere que la vida vos duga moltes coses boniques.

Retomando lo del peroné, que sepais que yo me alegro un montón de hebérmelo roto, porqué gracias a eso encontré a Alba, a mi alpaquita. Como mis manos estaban ocupadas con las muletas, necesitaba otras para poder trabajar en el laboratorio. Entonces apareció Alba, que iba a empezar con las PCR, y se convirtió en mis manos. En pocos días nos convertimos en un pack indivisible y así, hasta ahora. No tengo suficientes palabras para darte las gracias por haber estado siempre ahí, incluso nos acogiste a Janis y a mi en casa. Y menos mal que nos hemos tenido la una a la otra, menos mal amiga... Nadie más que tu y yo sabemos lo que esto ha sido. Espero que nos sigamos teniendo la una a la otra siempre.

A nuestra Bea, gracias por traer tanta alegría hasta en los días más difíciles. Lo que ha llovido desde ese GEEFSM juntas. Sé que hablo en nombre de Alba también cuando digo que sentimos mucho no haber podido estar más presentes allí. Y a Francesca, es una pena que no hayamos coincidido casi en el tiempo, sé que hubiésemos hecho un gran equipo de trabajo. ¡Os deseo todo lo mejor!

Muchísimas gracias a todos los habitantes del maravilloso despacho de becarios por haber creado una família, por ser esa pequeña alegría que te hace levantarte en los días más duros y ir al laboratorio a seguir y seguir. En especial a Miguel, por evitarme alguna que otra crisis de PCR, y por estar siempre ahí. Moltes gràcies amic.

Vull agrair la seua contribució a moltes altres persones que han participat en la tesi d'una o altra forma. A Víctor Lizana, per tots els moments compartits, per tantes converses interessants i per la motivació. A Carol Galiana, quina casualitat trobar una altra suecana al laboratori! Moltíssimes gràcies per la teua ajuda en els cultius d'aigües i per preocupar-te per mi en els moments complicats. Al equipo de parasitología de la Universidad CEU San Pablo de Madrid, en especial a Fernando Izquierdo y, sobretodo, a Ángela Magnet. Gracias por acogerme y colaborar en la identificación molecular de microsporidios. Fruto de ello ha salido un bonito trabajo

que ahora forma parte de esta tesis. A toda la gente de los servicios de secuenciación con los que hemos trabajado, en especial a Laura, del Centro de Investigación Príncipe Felipe, y a Carmen, de Seqplexing, por su asesoramiento y su comprensión con mis ajustados plazos. A Paco, Emilio y David, de Marbyt, por su ayuda en la última etapa de esta tesis con el análisis bioinformático, ha sido un placer trabajar con vosotros, os deseo todo lo mejor.

Now, it is the turn of České Budějovice (Czech Republic), where I did my international stay at the Laboratory of Functional Helminthology (Institute of Parasitology, Biology Centre CAS) with the amazing Ivona Mladineo. It has been a great pleasure to work with you (and with our little Anis) and to count on your support from before the stay until now. You were like a breath of fresh air that reactivated my motivation to continue my research. I can never thank you enough for everything you have done for me. Thank you also for showing me the city, training me in mushrooming, ice skating... and so much more! There will always be a place for you in Sueca (Valencia), and of course for Bunny and Fima.

I would also like to thank the other people in the lab (Armine, Tom, Gabi, Harryet...), Jerko for his collaboration from Croatia, and the people in František Marec's lab at the Institute of Entomology, especially Magda Zrzavá, for their valuable help with citogenetics. Part of this doctoral thesis is the result of that stay and all that was learned during and after it. I cannot end this part without thanking Tynka and especially Jana, my flatmate during all this time. I was incredibly lucky to have found such a nice person to share this time with. Thank you for helping me settle in, showing me a bit more of Czech life, and most of all, for the moments of conversation and laughter. Hope to see you soon!

Als amics de Sueca, al meu arcoiris de veterinàries, la familia de diversos de Múrcia i molts altres. Moltes gràcies a totes i tots per haver estat al meu costat i donar sentit i alegria a cada paset. En especial a Bea i a Sarai, per estar sempre ahí per a pegar una volteta i desconnectar. A Mar i a Laia, per compartir la lluita del doctorat i

donar-nos suport. Y a Marta, por estar siempre unidas a pesar de la distancia y del tiempo, por coger aviones para vernos y alegrarnos un poquito la vida.

Als meus pares. Moltes gràcies per la vostra ajuda i suport al llarg dels anys. Sense vosaltres hui no estaria escrivint els agraïments de la meua tesi doctoral. M'heu escoltat, m'heu intentat ajudar en tots els problemes que he tingut, heu cuidat a Janis sempre que ha calgut (i això que ja m'avisareu que em caldria ajuda quan l'adoptí i que m'ho pensara, jaja), i un llarg etcètera. ¡Ah! Gràcies també per ser el meu equip sardina, a vosaltres i a la tia. S'ha de veure el que fan els pares per una filla. Ja sé que em costa ser expressiva i carinyosa amb vosaltres, espere que aquestes paraules puguen servir un poquet per a mostrar el meu agraïment. Moltes gràcies de veritat, vos estime.

Dylan i Janis també es mereixen un lloc especial en aquests agraïments. Dylan es va traure la carrera de Veterinària en mi, hores i hores als meus peus, escoltant-me estudiar. I Janis, ella m'ha acompanyat al llarg de la tesi. Gràcies per la companyia, per transmetre pau en moments d'estrés, i per molt més.

I finalment, Andreu. Has estat al meu costat en l'etapa més complicada de la meua vida, i no m'has fallat mai. M'has escoltat, ajuda't, m'has fet sentir cuidada. Sent molt els moments en què jo no he pogut estar per a tu. Has sigut la meua felicitat enmig d'una gran tempesta i m'has fet vore que les coses vertaderament importants en la vida no són un treball o un títol, sinó els xicotets moments d'amor i alegria. Gràcies per tots eixos moments, els nostres balls espontanis, les nostres escapades als arrossars, i tantes altres coses. Per molt que ho intente no vaig a trobar paraules suficients per a expressar tot el que vull agrair-te, espere poder anar demostrant-ho al llarg dels anys. Si hem sigut capaços de construir una bonica relació enmig de les nostres tesis doctorals, tot el que queda per vindre no pot anar sinó a millor. Benvingut a la nova temporada d'Andreu i Sam. T'estime moltíssim.

GRÀCIES A TOTES I TOTS DE TOT COR.

ABSTRACT

Fish has core relevance in humans' diets all over the world, both for its importance in food security and for its enormous nutritional benefits. However, fish consumption is not exempt from risks, such as the presence of chemical pollutants or disease-causing biological agents, such as parasites. In particular, marine fish serve as hosts to a wide variety of parasites, including foodborne emerging zoonotic parasites, as nematodes of the genus *Anisakis*, of significant public health concern. Furthermore, they can also harbor other emerging zoonotic parasites originating from terrestrial environments, capable of reaching and contaminating marine waters. In both cases, the presence of these parasites in marine fish intended for human consumption represents a potential risk of transmission to humans. Given the distinct nature of these two groups of parasites and their varying research requirements, this doctoral thesis is structured into two parts.

The **first part**, consisting of two chapters, focused on the molecular detection and characterization of emerging unicellular zoonotic parasites of terrestrial origin in marine fish from the Spanish coast of the western Mediterranean. In the **first chapter**, different PCR techniques were employed to determine the prevalence of *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis* sp., and zoonotic microsporidia species in the gastrointestinal tract of three groups of marine fish from the coast of the Comunidad Valenciana (total N = 408): aquaculture fish, wild fish from the surroundings of the aquaculture facilities, and wild fish from extractive fisheries. Zoonotic species and subtypes were detected for all three parasites/parasite groups under study, namely *Cryptosporidium ubiquitum*, *Blastocystis* sp. subtypes (STs) ST5, ST6, and ST7, and *Encephalitozoon hellem*/*Encephalitozoon intestinalis*. However, the prevalences were very low, suggesting a limited risk of transmission through fish consumption in the studied fish populations.

In the **second chapter**, a metabarcoding dietary approach based on the V8-V9 region of the 18S rRNA gene was used to investigate the parasite community present in digestive samples from two ecologically and economically important pelagic fish species in the western Mediterranean, the European pilchard (*Sardina pilchardus*)

and the round sardinella (*Sardinella aurita*) (total N = 47). Organisms belonging to four parasitic classes were identified, with higher significant prevalence in European pilchards for Cestoda and Myxozoa. Unicellular zoonotic parasites (*Cryptosporidium* sp., *Blastocystis* sp., and *Kudoa thyrsites*) were found in very low presence and number of reads. However, false negatives were detected for *Cryptosporidium* and *Blastocystis*. Therefore, this technique proved useful for exploratory studies of parasite communities in both species but presented limitations in terms of coverage, taxonomic depth, and detection of rare or low abundant organisms. The use of alternative primers and hierarchical metabarcoding is suggested as an improvement for future studies.

The **second part**, corresponding to the **third chapter**, focused on *Anisakis pegreffii*, the most relevant zoonotic parasite transmitted through fish consumption in the Mediterranean basin. The primary objective was to contribute to the development of the *in vitro* life cycle of *A. pegreffii*, crucial for understanding key aspects of the host-parasite interaction and for providing biological material for subsequent research. Therefore, the fecundity and fertility window of two populations of *in vitro* cultured adult *Anisakis* (*Anisakis simplex* sensu lato (s.l.) and *A. pegreffii*) were evaluated; a protocol to obtain third-stage larvae (L3, the infective stage) from eggs laid by *A. pegreffii* adults in culture was developed; ultrastructural characteristics of recently hatched second-stage larvae (L2) of *A. pegreffii* were studied; and chromosomal extensions were obtained for karyotyping from gonadal tissue of adult *A. pegreffii*. Results showed high average fecundity, yielding sufficient biological material (eggs and larvae) for additional experiments. The *in vitro* protocol successfully produced L3 larvae that were maintained in culture for up to 17 weeks. Ultrastructural examination revealed relevant features, including the presence of the excretory gland cell (of utmost relevance in *Anisakis* pathogenicity) in larvae as young as 48 hours old, as well as the release of extracellular vesicles and cell-free mitochondria. Finally, a diploid karyotype, potentially 2n = 18, was obtained.

RESUMEN

El pescado tiene una relevancia fundamental en la dieta de los seres humanos en todo el mundo, tanto por su importancia en la seguridad alimentaria como por sus enormes beneficios nutricionales. Sin embargo, el consumo de pescado no está exento de riesgos, como la presencia de contaminantes químicos o agentes biológicos causantes de enfermedades, como los parásitos. En particular, los peces marinos son hospedadores de una amplia variedad de parásitos, incluyendo parásitos zoonósicos emergentes de tansmisión alimentaria, como es el caso de los nematodos del género *Anisakis*, que representan una gran preocupación para la salud pública. Además, también pueden albergar otros parásitos zoonósicos emergentes que tienen su origen en el medio terrestre y que son capaces de alcanzar y contaminar las aguas marinas. En ambos casos, la presencia de estos parásitos en peces marinos destinados al consumo constituye un potencial riesgo de transmisión a los seres humanos. Dada la diferente naturaleza de estos dos grupos de parásitos y sus diferentes necesidades de investigación, la presente tesis doctoral se estructura en dos partes.

La **primera parte**, compuesta por dos capítulos, se enfocó en la detección y caracterización molecular de parásitos unicelulares zoonósicos emergentes de origen terrestre en peces marinos de la costa española del Mediterráneo occidental. En el **primer capítulo**, se utilizaron diferentes técnicas de PCR para determinar la prevalencia de *Crytposporidium* spp. *Blastocystis* sp. y especies zoonósicas de microsporidios en el tracto gastrointestinal de tres grupos de peces marinos de la costa de la Comunidad Valenciana (N total = 408): peces de acuicultura, peces silvestres de las immediaciones de las explotaciones de acuicultura y peces silvestres procedentes de pesca extractiva. Se detectaron especies y subtipos zoonósicos para los tres parásitos/grupos parasitarios objeto de estudio, a saber, *Cryptosporidium ubiquitum*, *Blastocystis* sp. subtipos (STs) ST5, ST6 y ST7, y *Encephalitozoon hellem*/*Encephalitozoon intestinalis*. Sin embargo, las prevalencias fueron muy bajas, lo que sugiere un riesgo limitado de transmisión por consumo de pescado en las poblaciones de peces estudiadas.

En el **segundo capítulo** se empleó un enfoque de metabarcodificación para dieta basado en la región V8-V9 del gen 18S rRNA para estudiar la comunidad de párasitos presente en muestras digestivas de dos especies de peces pelágicos de gran importancia ecológica y económica en el Mediterráneo occidental, la sardina Europea (*Sardina pilchardus*) y la alacha (*Sardinella aurita*) (N total = 47). Se identificaron organismos pertenecientes a cuatro clases parasitarias, con una prevalencia significativamente mayor en las sardinas para Cestoda y Myxozoa. Se detectaron parásitos zoonósicos unicelulares (*Cryptosporidium* sp., *Blastocystis* sp., y *Kudoa thyrsites*) en baja presencia y cantidad de lecturas. Sin embargo, se detectaron falsos negativos para *Cryptosporidium* y *Blastocystis*. Por lo tanto, esta técnica resultó útil para el estudio exploratorio de las comunidades parasitarias de ambas especies, pero presentó limitaciones en términos de cobertura, profundidad taxonómica y detección de organismos raros o poco abundantes. Se sugiere el empleo de otros primers y la metabarcodificación jerarquizada como mejora para futuros estudios.

La **segunda parte**, correspondiente con el **capítulo 3**, se centró en *Anisakis pegreffii*, el parásito zoonósico transmitido por consumo de pescado de mayor relevancia en salud pública en la cuenca Mediterránea. El objetivo principal fue contribuir al desarrollo del ciclo biológico *in vitro* de *A. pegreffii*, crucial para la comprensión de aspectos clave de la interacción hospedador-parásito y para proporcionar material biológico para investigaciones posteriores. Así pues, se evaluó la fecundidad y ventana de fertilidad de dos poblaciones de *Anisakis* adultos cultivados *in vitro* (*Anisakis simplex* sensu lato (s.l.) y *A. pegreffii*); se desarrolló un protocolo para obtener larvas de tercer estadio (L3, la fase infectante) a partir de huevos depositados por adultos en cultivo de *A. pegreffii*; se estudiaron las características ultrastructurales de las larvas de segundo estadio (L2) recién eclosionadas de *A. pegreffii*; y se obtuvieron extensiones cromosómicas para cariotipado a partir del tejido gonadal de adultos de *A. pegreffii.* Los resultados mostraron una elevada fecundidad media, dando lugar a suficiente material biológico (huevos y larvas) para experimentos adicionales. El protocolo *in vitro* logró producir larvas L3 que se

mantuvieron en cultivo hasta 17 semanas. El estudio ultraestructural reveló características relevantes, como la presencia de la célula de la glándula excretora (sitio de mayor relevancia en la patogenicidad de *Anisakis*) en larvas de tan solo 48 horas, o la descarga de vesículas extracelulares y mitocondrias libres. Por último, se obtuvo un cariotipo diploide, potencialmente 2n = 18.

CONTENTS

CONTENTS

INDEX OF TABLES

INTRODUCTION

CHAPTER 1

CHAPTER 2

CHAPTER 3

ANNEXES

INDEX OF FIGURES

INTRODUCTION

CHAPTER 1

CHAPTER 3

ANNEXES

INDEX OF ABBREVIATIONS

ºC	degree Celsius
µg	microgram
µL	microlitre
µM	micromolar
16S/18S rRNA	16S/18S ribosomoal ribonucleic acid
ADS	Asociación de Defensa Sanitaria
ASVs	Amplicon sequence variants
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pairs
COI	cytochrome c oxidase subunit 1 gene
cox2	cytochrome c oxidase subunit 2 gene
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CS	chicken serum
Ct	cycle threshold
DAPI	4′,6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonucleic acid
EGC	excretory gland cell
EIDs	(re)emerging infectious diseases
ESPs	excretory/secretory products
EVs	extracelular vesicles
EWUP	emerging waterborne unicellular parasites
FAO	Food and Agriculture Organization
FISH	fluorescence *in situ* hybridization
g	gram
GFCM	General Fisheries Commission for the Mediterranean
GP60	60-kDa glycoprotein gene
h	hour
ID	identity
ITS	internal transcribed spacer region gene
L	litre
L2	second-stage larva/e
L3	third-stage larva/e

L3P	large third-stage larva phenotype
L4	fourth-stage larva/e
M	molar
m	metre
mg	miligram
min	minute
mL	mililitre
ML	Maximum-Likelihood
mm	milimetre
mM	milimolar
mOsm	milliosmoles
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	nanogram
NGS	next generation sequencing
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
OTUs	operational taxonomic units
p	*p*-value
PCR	polymerase chain reaction
pM	picomolar
pmol	picomol
P/S	penicillin/streptomycin
QC	query cover
RFLP	restriction fragment length polymorphism
s	second
S3P	small third-stage larva phenotype
SAR	Stramenopiles, Alveolata, and Rhizaria
SDGs	Sustainable Development Goals
SDM	Schneider's *Drosophila* medium
SE	standard error
s.l.	sensu lato
SNV	single nucleotide variant
s.s.	sensu stricto

SSC	sodium citrate buffer
SSS	sea salt solution
ST	subtype
STD	standard deviation
TEM	transmission electron microscopy
Tm	melting temperature
WHO	World Health Organization