

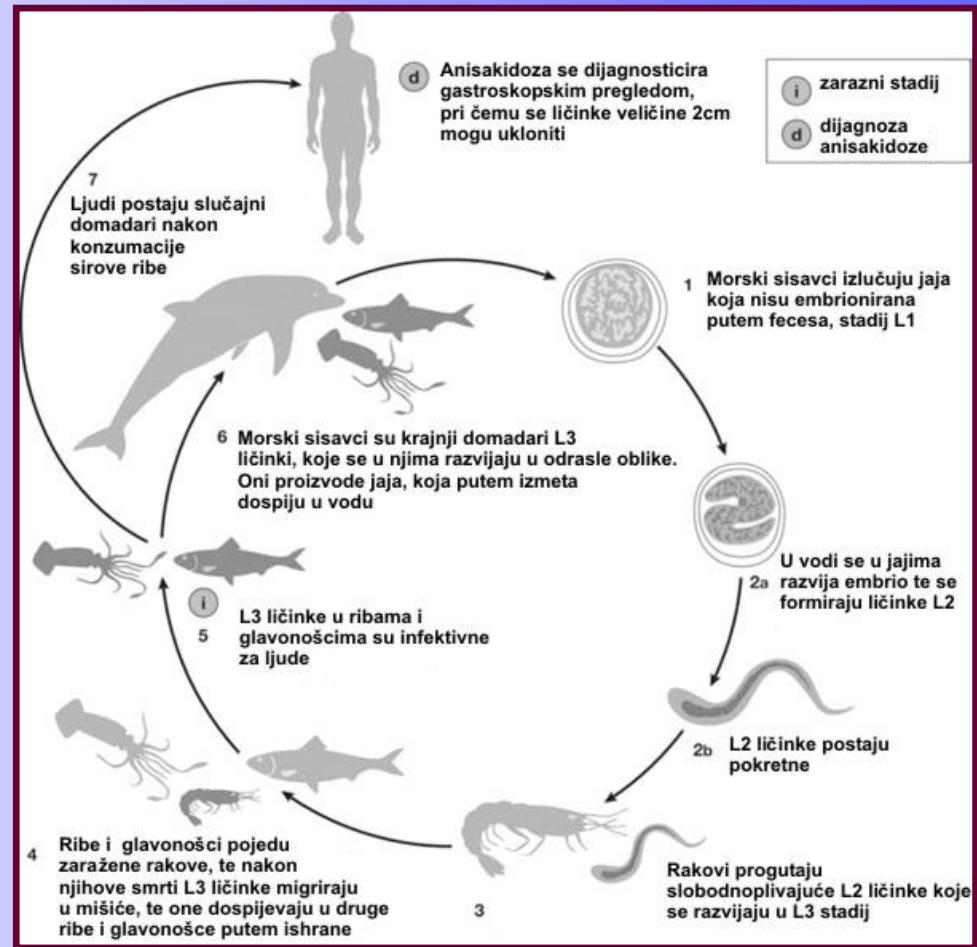
MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA LIČINKI ANISAKISA (ANISAKIDAE) IZ RIBA U JADRANSKOM MORU

Irena Vardić Smrzlić, Damir Valić, Damir Kapetanović, Božidar Kurtović, Zlatica Teskeredžić, Emin Teskeredžić

*Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša,
Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama,
Bijenička c. 54, 10000 Zagreb, Hrvatska e-mail: ivardic@irb.hr*

7. Međunarodni gospodarsko-znanstveni skup u ribarstvu

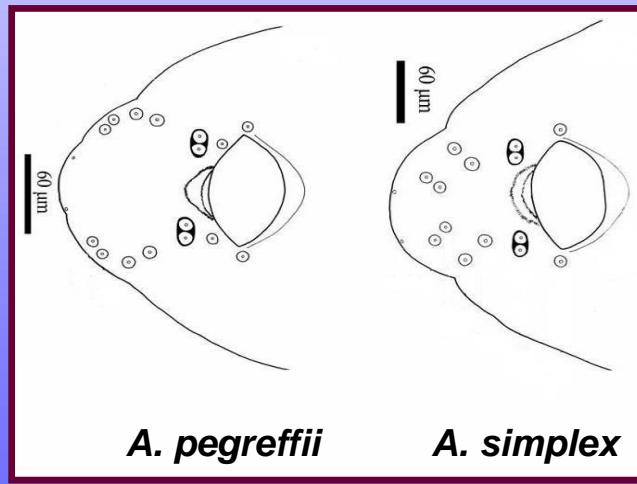
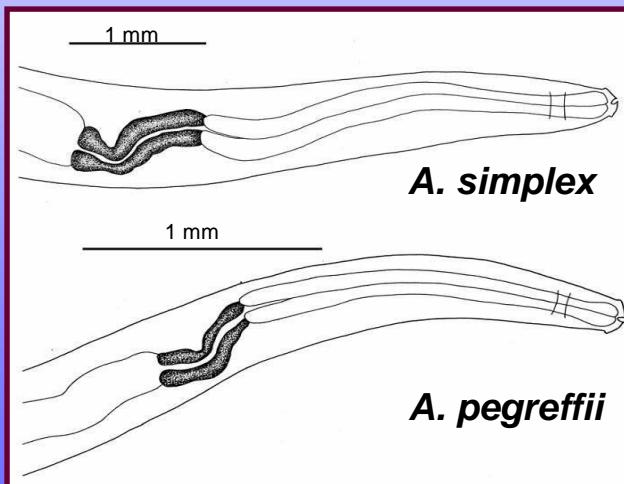
- Rod Anisakis - *nametnički oblici*
Porodica Anisakidae
Red Ascaridida
Koljeno Nematoda
- Parazitiraju u velikom broju vrsta **morskih i slatkovodnih riba**
- Uzrokuju **zoonoze-anisakidoze**, a ljudi najčešće obolijevaju od konzumiranja sirove ribe
- Imaju **složen životni ciklus**



Prema Hochberg i Hamer (2010) Clin Infect Dis

UVOD ANISAKIS – MORFOLOŠKA RAZNOLIKOST

- Morfološka svojstva se razlikuju kod odraslih jedinki, ali teže kod ličinki
 - Veličina i položaj **zubića** na prednjem dijelu tijela
 - Veličina **žljezdanog dijela – želudac (ventriculus)**
 - Veličina **bodlje (spicule)** kod mužjaka
 - Broj i položaj **kaudalnih papila** kod mužjaka
 - Veličina **mukrona (repica)** na stražnjem dijelu tijela
- Morfološka svojstva najčešće nisu dovoljna za točnu determinaciju vrsta ličinki, već se danas determinacija vrši pomoću molekularnih biljega.



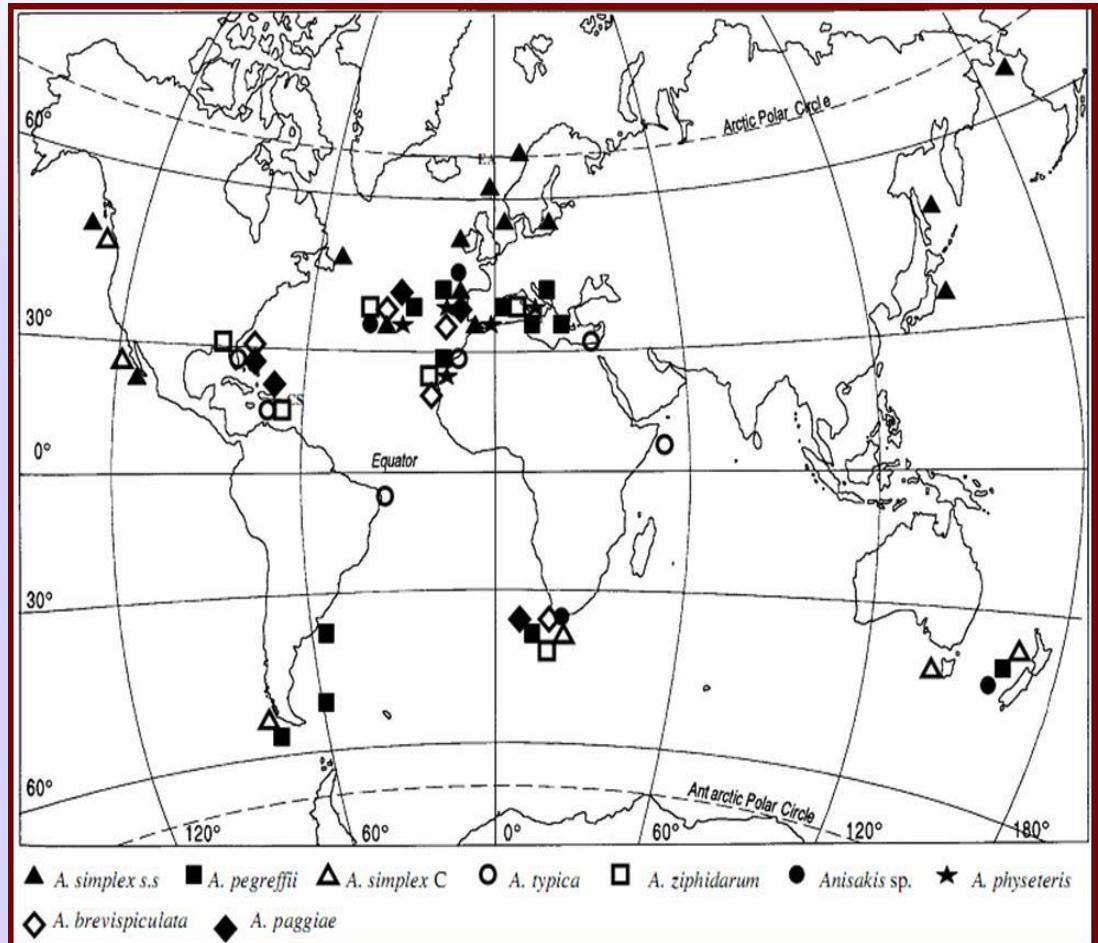
Prema Quiazone i sur., (2008) Parasitol Int

UVOD ANISAKIS – BIORAZNOLIKOST I RASPROSTRANJENOST

Poznato 9 vrsta Anisakis spp.:

1. *Anisakis simplex (s.s.)*
 2. *A. simplex C*
 3. *A. pegreffii*
 4. *A. typica*
 5. *A. ziphidarum*
 6. *A. nascetti*
- Grupa I**

7. *A. physeteris*
 8. *A. brevispiculata*
 9. *A. paggiae*
- Grupa II**



Prema Mattiucci i Nascetti (2006), Parasite

SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

- Tijekom ispitivanja zdravstvenog stanja tune (*Thunnus thynnus*) na tovilištu u Jadranskom moru i divlje populacije riba neposredno pored uzgojnih kaveza, ličinke anisakisa pronađene su u svim pregledanim vrstama riba iz divlje populacije.
- Cilj istraživanja bio je:
 - determinirati vrste ličinki anisakisa na temelju mitohondrijske i genomske DNA
 - istražiti unutarpopulacijske razlike pronađenih vrsta anisakisa na razini DNA biljega

MATERIJALI I METODE

Broj uzorka	Vrsta ribe	Vrijeme uzorkovanja	Mjesto uzorkovanja	Broj riba
Uzorak 1	Tuna (<i>Thunnus thynnus</i>)	lipanj, 2009	tovilište	n=3
		srujanj, 2010		
		studeni, 2010		
Uzorak 2	Šarun (<i>Trachurus trachurus</i>)	srujanj, 2010	neposredno oko tovilišta	n=14
		studeni, 2010		
	Lokarda (<i>Scomber japonicus</i>)	srujanj, 2010		n=3
		studeni, 2010		
	Ušata (<i>Oblada melanura</i>)	srujanj, 2010		n=3
		studeni, 2010		
Uzorak 3	Šarun 1	veljača, 2011	ribarnica u Zagrebu	n=2
	Šarun 2			n=2



Tovilište tuna na srednjem Jadranu

MATERIJALI I METODE

- Biometrijsko mjerenje riba i klinička pretraga
- Morfološka karakterizacija nametnika – bojanje “Semichon`s acetocarmine” ili direktnim prosvjetljavanjem (metil-salicilat)
- Molekularna karakterizacija na temelju molekularnih biljega:
 - ***ITS regije*** (unutarnje razmaknice rRNA): jezgrin biljeg
 - ***Cox1*** (podjedinica 1 citokrom oksidaze): mitohondrijski biljeg
 - Izdvajanje ukupne DNA
 - Umnožavanje gena Cox1
 - Umnožavanje regije ITS
 - Restrikcijska analiza regije ITS enzimom Hhal
 - Određivanje sljedova nukleotida dijelova gena COI i regije ITS
 - Analiza sljedova nukleotida u programima ClustalX i Blast, te izrada filogenetskih stabala u programu MEGA 4.1

REZULTATI – BIOMETRIJA RIBA

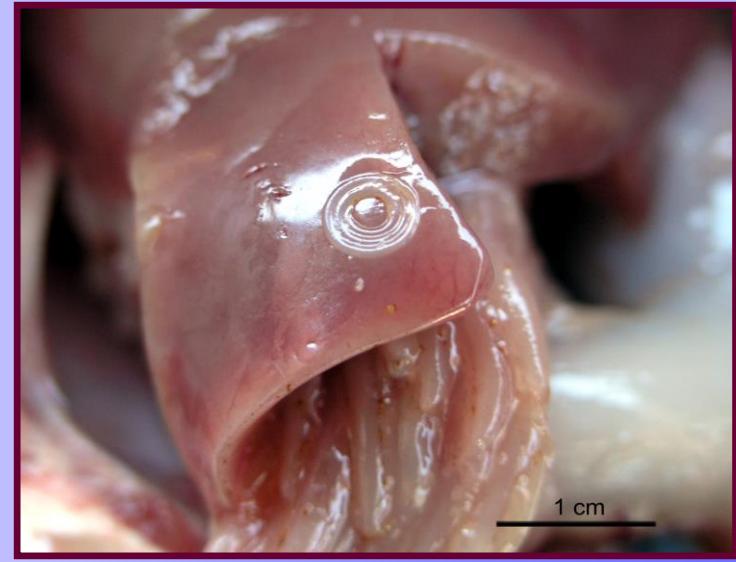
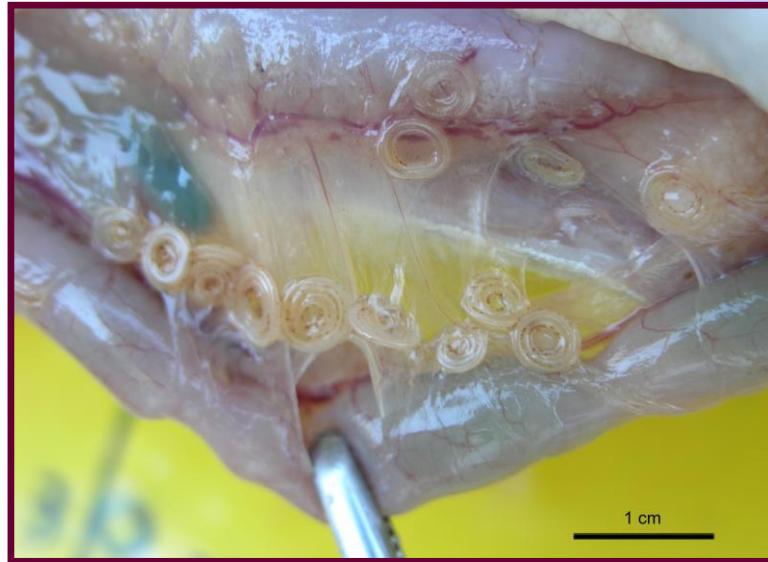
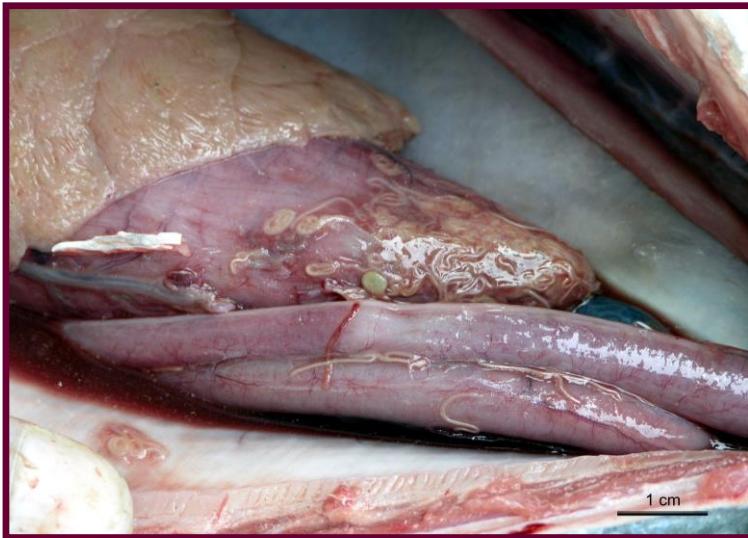
Uzorak 1	Vrsta	TL (cm)	SL (cm)	Spol	Broj anisakisa
3.6.2009.	Tuna	93,0	81,0	-	>150
1.7.2010.		132,0	114,0	-	-
11.11.10.		151,0	134,0	♀	-

Uzorak 3	Vrsta	TL (cm)	SL (cm)	Spol	Broj anisak.
veljača 2011	šarun	28,3	24,2	♀	157
		28,0	24,1	♀	212
		27,8	23,9	♀	183
		28,3	24,4	♂	212
s.v. ± st.dev	n=4	28,1 ± 0,25	24,2 ± 0,21	3 ♀ 1 ♂	191 ± 26,5

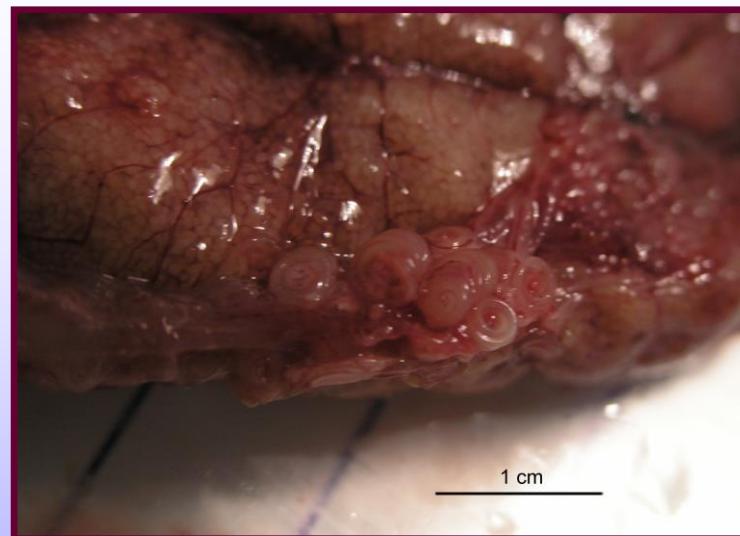
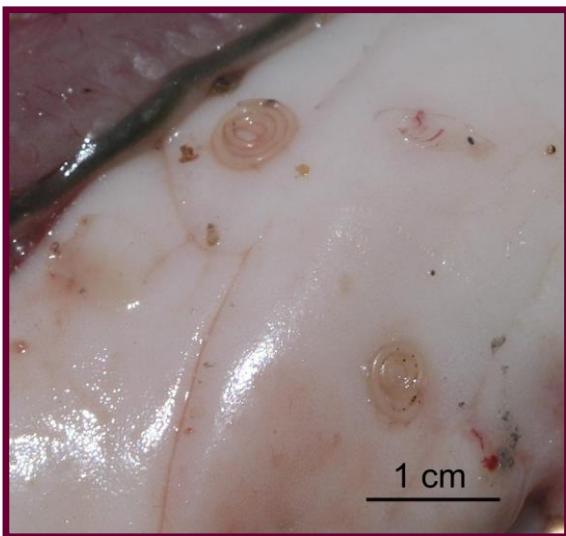
Uzorak 2	Vrsta	TL (cm)	SL (cm)	Spol	Broj anisakisa
01. srpnja 2010.	Ušata	27,0	23,0	♀	> 50
	Šarun	37,0	33,5	♀	<50
	Šarun	34,0	30,0	♀	<50
	Lokarda	44,0	39,5	-	<50
	Šarun	-	-	♂	<50
	Šarun	32,0	29,0	♂	<50
	Šarun	36,0	32,0	♂	<50
	Šarun	31,5	29,5	♂	<50
	Šarun	33,0	29,5	♀	<50
	Šarun	34,5	31,0	♀	<50
11. studeni 2010.	Ušata	30,5	27,0	♂	> 50
	Lokarda	41,5	37,0	♀	<50
	Lokarda	38,8	34,8	♀	<50
	Šarun	33,0	28,9	♀	<50
	Šarun	31,8	27,2	♀	<50
	Šarun	36,0	20,5	♀	<50
	Šarun	35,2	30,8	♀	<50
	Šarun	30,9	26,1	♀	<50
	Šarun	33,6	28,5	♀	<50
	Ušata	34,0	28,4	♀	> 50
s.v. ± st.dev	Šarun n= 13	33,7 ± 1,93	26,7 ± 2,23	10 ♀ 3 ♂	-
	Lokarda n=3	41,4 ± 2,60	37,1 ± 2,35	2 ♀	-
	Ušata n=3	30,5 ± 3,50	26,1 ± 2,80	2 ♀ 1 ♂	-

TL – ukupna duljina, SL – standardna duljina, s.v. – srednja vrijednost, st.dev. – standardna devijacija

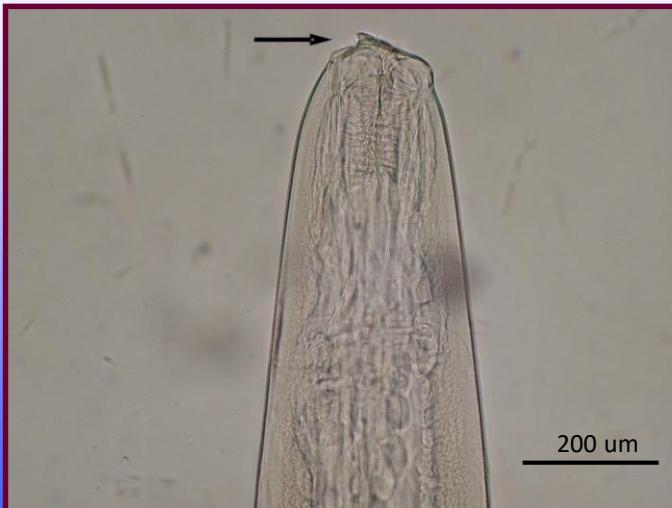
REZULTATI – PRETRAGA NAMETNIKA U RIBAMA



REZULTATI – PRETRAGA NAMETNIKA U RIBAMA



REZULTATI – MORFOLOŠKA ANALIZA



Zubić na prednjem dijelu tijela



Mukron (repić) na stražnjem dijelu tijela

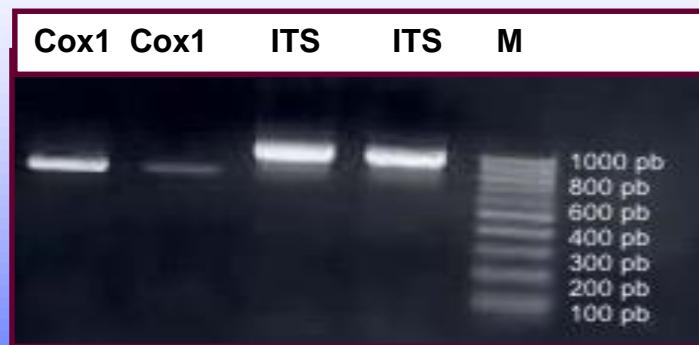


Želudac (ventriculus)

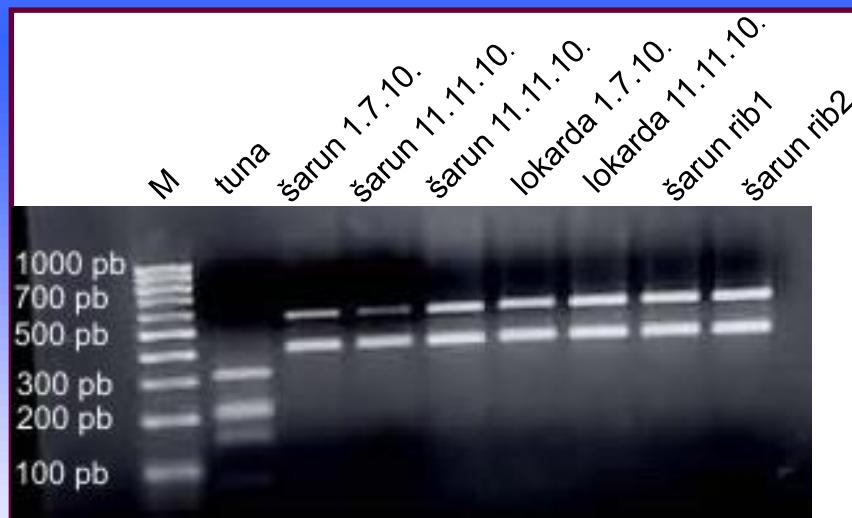


Jaje (ne-embrionirano) L1stadij

REZULTATI – MOLEKULARNA ANALIZA



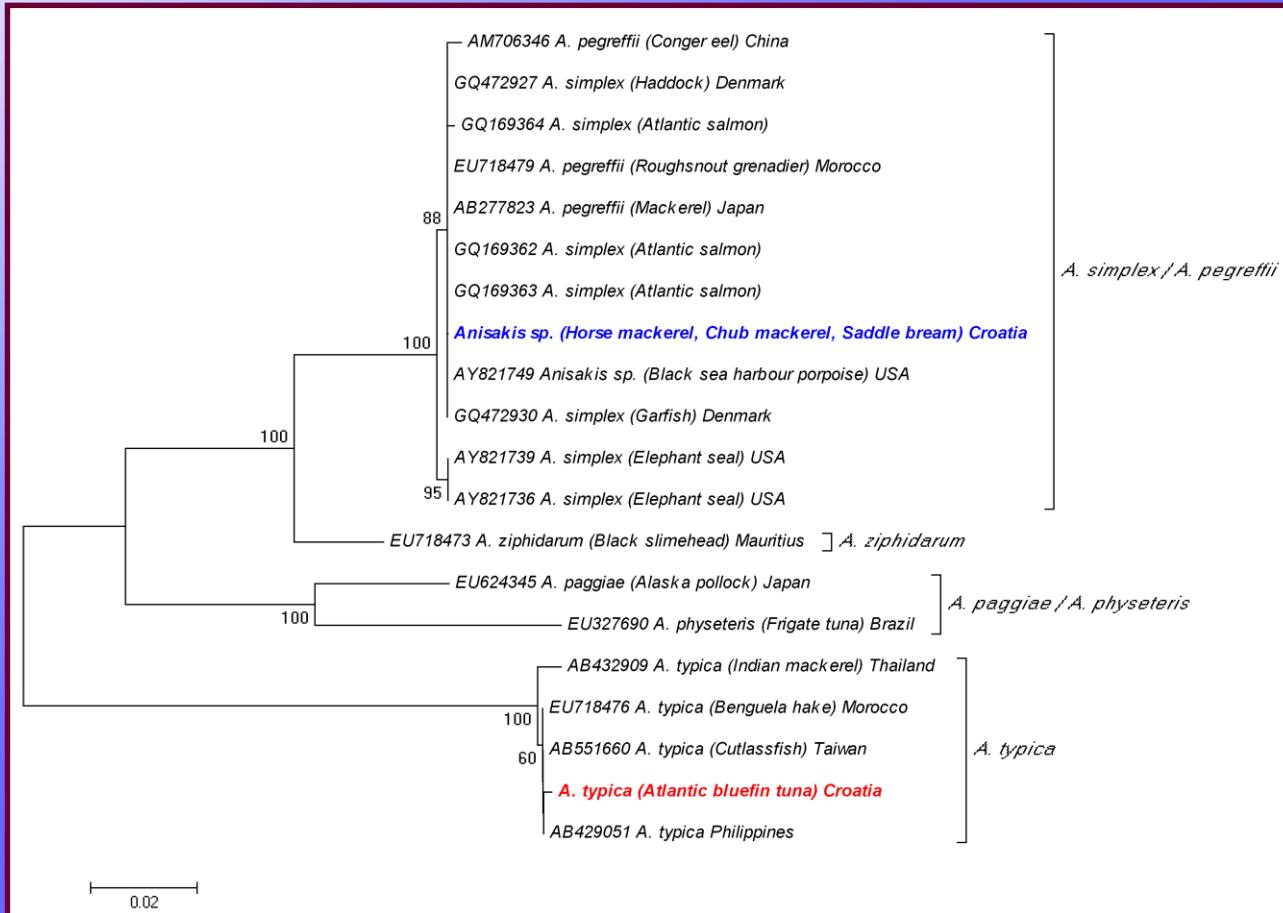
Analiza umnoženih produkata reakcija PCR u gelu agaroze, Cox1 – (713 pb);ITS – (910 pb),
M – mol. standard 100 pb



Analiza umnoženih produkata reakcija PCR u gelu agaroze nakon endonukleazne
restrikcije regije ITS enzimom Hhal, M – mol. standard 100 pb

REZULTATI – MOLEKULARNA ANALIZA

Analizom sljedova nukleotida utvrđene različite vrste Anisakis spp.: u tunama (*A. typica*) i ostalim vrstama riba (*A. pegreffii*).



ITS regije pokazale malu varijabilnost:

100% identičnost u slučaju *A. pegreffii* i 99,6 % u slučaju *A. typica*.

REZULTATI – MOLEKULARNA ANALIZA

Razlika u ITS regijama između *A. pegreffii* i *A. simplex* je u 2 nukleotida na položajima 244 pb i 260 pb (Farjallah i sur., 2008) i na osnovi te razlike potvrđena vrsta *A. pegreffii*.

A.pegreffii	AGCAG C AGCTTAAGGCAGAGTC G AGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGTGGCCGCCAAAA	239
A.simplex	AGCAG T AGCTTAAGGCAGAGT T GAGCAGACTTAATGAGCCACGCTAGGTGGCCGCCAAAA	239
	*****	*****

Cox1 regije su pokazale veću varijabilnost (98,9% - 100%) za anisakis iz divlje populacije riba, a najveći broj varijabilnih mesta (7) zabilježen je kod anisakisa iz šaruna iz ribarnice.

Cox1 regije nisu se pokazale dobrom markerom za usporedbu s poznatim sljedovima nukleotida anisakisa iz genske banke podataka, zbog malog broja pohranjenih sljedova (za analizu su korištene uglavnom Cox2 regije).

Nije zabilježena razlika u sljedovima nukleotida Cox1 regije između anisakisa koji potječu iz različitih vrsta riba (npr. šarun – lokarda), već je postojala između riba uzorkovanih na različitim mjestima (šarun uz uzgajalište – šarun s tržnice).

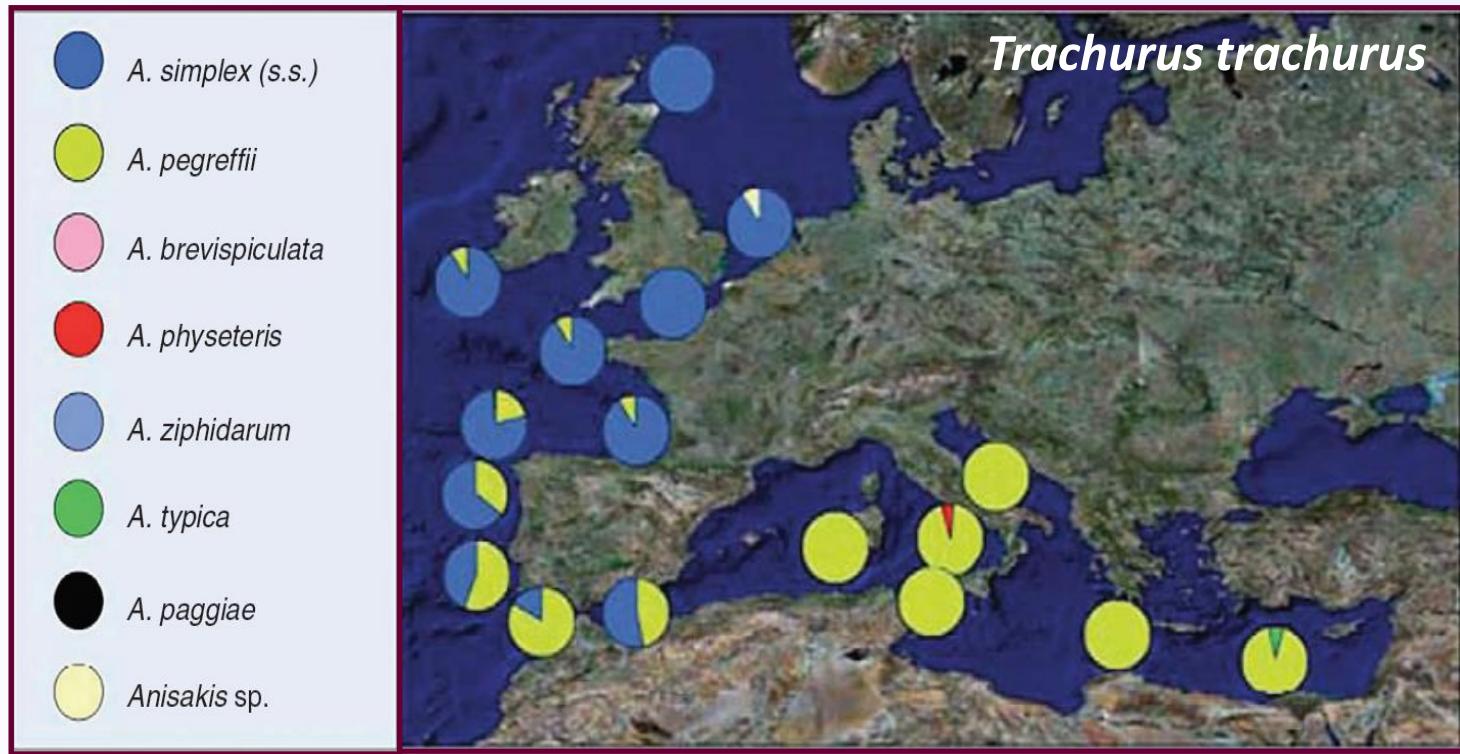
A. typica iz tuna se grupirao odvojeno od anisakisa pronađenih u ostalim ribama, a u genskoj banci podataka nije bilo pohranjenih sljedova nukleotida Cox1 gena za ovu vrstu.

RASPRAVA I ZAKLJUČCI

- U Hrvatskoj su nalazi anisakisa, *A. simplex*, u ribama iz Jadranskog mora potvrđeni prijašnjih godina (Mladineo, 2003; Žilići i Mladineo, 2006) , ali se oni baziraju na morfološkim analizama
- Molekularne analize anisakisa iz našeg istraživanja pokazale su prisutnost vrsta *A. pegreffii* (kompleks *A. simplex*) u šarunima, lokardama i ušatima, te *A. typica* u tunama
- ITS regije su se pokazale dobrom molekularnim biljegom u determinaciji anisakisa:
 - restrikcijska analiza ITS regija omogućila je razlikovanje između vrsta
 - analiza sljedova nukleotida ITS regija omogućila je determinaciju vrsta
- Cox1 gen se pokazao dobrom biljegom u određivanju varijabilnosti unutar iste vrste

RASPRAVA I ZAKLJUČCI

- Šaruni i lokarde su učestali domadari ličinki anisakisa, a nalaz *A. pegreffii* u njima je u skladu s nalazima *A. pegreffii* u šarunima iz Mediterana



Rasprostranjenost različitih vrsta anisakisa u šarunima iz europskog područja

RASPRAVA I ZAKLJUČCI

- Nalaz *A. typica* prvi je nalaz ove vrste u Jadranskom moru, a zanimljivo je da je pronađen upravo u tovljenim tunama.
- Tovljene tune hrane se svježom sitnom plavom ribom (srdeli, inčun, papalina) te smrznutim srdelama i haringama, pretežno iz uvoza (uz do 10% glavonožaca), pa postoji mogućnost invazije tuna anisakisom uslijed ishrane. Duboko smrzavanje s učincima sitne kritalizacije tijekom dužeg vremena uništava ove nametnike.

*U zdravstvenoj skrbi čovjeka
u Hrvatskoj ova bolest je
potpuno zanemarena.
Potrebno istaknuti važnost
termičke obrade ili dubinskog
smrzavanja morskih plodova.*

**“A healthy marine
ecosystem is one with
high level of infections by
anisakid nematodes”**
Mattiucci i Nascetti (2008)

Hvala na pažnji

Ovaj rad izrađen je u okviru hrvatskog nacionalnog monitoring programa "Sustavno istraživanje Jadranskog mora kao osnova održivog razvijanja Republike Hrvatske"