
PRELIMINARNO ISTRAŽIVANJE RAZNOLIKOSTI I DISTRIBUCIJE PRIPADNIKA ZOONOTIČNOG RODA *ANISAKIS* SPP. U MORSKIH SISAVACA JADRANA

Kristina Blažeković¹, Ivana Lepen Pleić², Tomislav Gomerčić¹, Martina Đuras¹,
Ivona Mladineo²

¹Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

²Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu

E-mail: mladineo@izor.hr

Osnovni cilj istraživanja bio je utvrditi vrijednosti populacijske dinamike oblića *Anisakis* spp. (prevalencija, abundancija, intenzitet) u njegovim krajnjim domaćinima u hrvatskom dijelu Jadranskog mora; morskim sisavcima krupnozubom kitu (*Ziphius cavirostris*), glavatom dupinu (*Grampus griseus*), plavobijelom dupinu (*Stenella coeruleoalba*) i dobrom dupinu (*Tursiops truncatus*). Ujedno, cilj je bio identificirati vrste roda *Anisakis* molekularnim metodama, s obzirom da se morfološka identifikacija može izvesti samo do razine roda. U tu svrhu korišteni su arhivirani i svježi uzorci probavila dupina, prikupljeni u razdoblju od listopada 1990. do travnja 2012. godine u okviru projekta Veterinarskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu (Zdravstvene i biološke osobitosti populacija morskih sisavaca u Jadranu).

Prevalencija oblića u uginulim kitovima zubanima (n=181) iznosila je 28,73% (95% interval pouzdanosti od 22,5% do 35,9%), odnosno 31,90% (95% interval pouzdanosti od 25,1% do 39,5%) kada se oduzmu iz uzorka mladi kitovi u dobi do godinu dana. Srednja abundancija oblića u 163 domaćina te vrste iznosila je 1209,96 jedinki oblića, s granicama intervala pouzdanosti 95% utvrđenim „bootstrap“ metodom replika od 510,4 do 2764,9, dok je srednji intenzitet oblića iznosio 3781,13 uz 95% interval pouzdanosti od 1778,9 do 7128,4. Usporedbom očekivanih frekvencija teoretskog modela negativne binomne razdiobe sa stvarnim frekvencijama podataka, uz korištenje metode najveće vjerojatnosti (maximum likelihood), nije utvrđeno značajno odstupanje ($\chi^2=24.6769$, $p>0,05$), što znači da *Anisakis* spp. pokazuje očekivanu negativnu binomnu razdiobu u populaciji domaćina. Prevalencija oblića *Anisakis* spp. u dobrim dupina (bez jedinki do godine dana) iznosila je 26,92% (95% interval pouzdanosti od 19,94% do 35,34 %), a u plavobijelih dupina 52% (95% interval pouzdanosti od 31,71% do 70,41%), što upućuje na statistički značajne razlike u prevalencijama između različitih domaćina.

Amplifikacijom fragmenta lokusa citokrom oksidaze 2 mitohondrijske DNK (~600 bp) ukupno 165 jedinki oblića, izoliranog iz četiri vrste krajnjeg

domaćina, filogenetskom analizom je utvrđena prisutnost najmanje tri vrste pripadnika roda *Anisakis* u Jadranu: *A. pegreffii* (96,73%), *A. physeteris* (1,31%) i *A. simplex* (1,96%). Analizom sastava vrsta oblića s obzirom na vrstu domaćina, utvrđena je mješovita infekcija u dobrim dupina (*A. pegreffii* 97,44% i *A. simplex* 2,56%), plavobijelih dupina (*A. pegreffii* 97,62% i *A. simplex* 2,38%) i krupnozobog dupina (*A. pegreffii* 75% i *A. physeteris* 25%), dok su glavati dupini bili zaraženi jednom vrstom (*A. pegreffii* 100%). Analizom genetske strukture populacije najzastupljenije vrste *A. pegreffii* (n=148) utvrđeno je 47 polimorfni mjesta u amplificiranom fragmentu, odnosno 38 haplotipova, od kojih je najveći postotak (66%) pripadao jedinstvenim haplotipovima (25) zastupljenim s jednom jedinkom. Računanjem genetskih indeksa raznolikosti dobivena je visoka vrijednost ukupne raznolikosti haplotipova (h) 0,6360 +/- 0,0471, te niska vrijednost nukleotidne raznolikosti (π) 0,004520 +/- 0,002706, što upućuje na nedavno usko grlo populacije i naglu posljedičnu ekspanziju.

Ovi preliminarni rezultati istraživanja upućuju na iznimnu raznolikost i široku rasprostranjenost vrsta roda *Anisakis* što se kosi s našim dosadašnjim spoznajama za Jadran, ali ukazuju i na potrebu sustavnog i ciljanog istraživanja ovog zoonotičnog nametnika u njegovom krajnjem domaćinu.

Preliminary study of the variety and distribution of zoonotic genus *Anisakis* spp. in sea mammals of the Adriatic Sea

Kristina Blažeković, Ivana Lepen Pleić, Tomislav Gomerčić, Martina Đuras,
Ivona Mladineo

E-mail: mladineo@izor.hr

The main goal was to determine population dynamics (prevalence, abundance, intensity) of nematode *Anisakis* spp. in the sea mammals as final hosts in the Croatian part of the Adriatic Sea: Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*), Risso's dolphin (*Grampus griseus*), striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) and in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). The goal was also to identify the species within the genus *Anisakis* by use of molecular methods, because the morphology allows only genus level identification. We used the archived and fresh samples of dolphin digestive tracts collected in the period from October 1990 till April 2012 within the project Health and Biology of Sea Mammal Populations in the Adriatic at the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Zagreb.

The prevalence found in all dead Odontoceti dolphins (n=181) was 28.73% (95% confidence interval from 22.5% to 35.9%), or for dolphins of age more than one year only it was 31.90% (95% confidence interval 25.1% - 39.5%). Mean abundance in 163 positive hosts was 1209.96 individual worms with confidence interval 95% as determined by bootstrap method replica 510.4 – 2764.9, while the mean worm intensity was 3781.13 with 95% confidence interval 1778.9 – 7128.4. Comparing expected frequencies of theoretical model of negative binominal distribution with real data frequencies and use of maximum likelihood method, no significant deviation was found ($\chi^2=24.6769$, $p>0.05$), meaning that *Anisakis* spp. exhibits the expected negative binomial distribution within the population of hosts. Prevalence of nematode *Anisakis* spp. in bottlenose dolphins (without individuals bellow the age of 1 year) was 26.92% (95% confidence interval 19.94% - 35.34 %) and in striped dolphins 52% (95% confidence interval 31.71% - 70,41%), indicating statistically significant differences among different hosts.

Amplification of a fragment of locus of cytochrome oxidase 2 mitochondrial DNA (~600 bp) of a total of 165 individual nematodes isolated from four final hosts, phylogenetic analyses revealed the presence of a minimum of three species of the genus *Anisakis* in the Adriatic: *A. pegreffii* (96,73%), *A. physeteris* (1.31%) and *A. simplex* (1.96%). Analyses of nematode species in relation of the host species showed mixed infections in bottlenose dolphins (*A. pegreffii* 97.44% and *A. simplex* 2.56%), striped dolphins (*A. pegreffii* 97.62% and *A. simplex* 2.38%) and in Cuvier's beaked whale (*A. pegreffii* 75% and *A. physeteris* 25%), while Risso's dolphin were hosting only one species (*A. pegreffii* 100%). Genetic structure of the most frequent species *A. pegreffii* (n=148) 47 polymorphic sites were determined in the amplified fragment, or 38 haplotypes, with the highest percentage (66%) belonging to the unique haplotypes (25) represented by one individual. Calculation of genetic diversity indices gave the high total diversity of haplotypes (h) 0.6360 +/- 0.0471, and low value of nucleotide diversity (π) 0.004520 +/- 0.002706, suggesting recent bottleneck of population and fast consequent expansion.

Our preliminary results suggest exceptional diversity and broad distribution of species within the genus *Anisakis* what is contrary to previous knowledge for the Adriatic, but invites for systematic and targeted research of this zoonotic parasite in its final host.

HRVATSKA AKADEMIJA
ZNANOSTI I UMJETNOSTI

Razred za medicinske znanosti
Odbor za animalnu i komparativnu patologiju



Simpozij

**PARAZITARNE ZOONOZE I TEŠKI METALI
U KOPNENIH I MORSKIH PREDATORA**

**Parasitic zoonoses and heavy metals
in terrestrial and marine predators**

SAŽETCI
Abstracts

palača Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti, Zrinski trg 11, Zagreb

Zagreb, 20. svibnja 2013.

Organizator

HRVATSKA AKADEMIJA ZNANOSTI I UMJETNOSTI

Razred za medicinske znanosti

Odbor za animalnu i komparativnu patologiju

HRVATSKA AKADEMIJA
ZNANOSTI I UMJETNOSTI

Razred za medicinske znanosti
Odbor za animalnu i komparativnu patologiju



Simpozij

**PARAZITARNE ZOOZOZE I TEŠKI METALI
U KOPNENIH I MORSKIH PREDATORA**

**Parasitic zoonoses and heavy metals
in terrestrial and marine predators**

SAŽETCI
Abstracts

palača Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti, Zrinski trg 11, Zagreb

Zagreb, 20. svibnja 2013.

Znanstveni odbor

Redoviti članovi
Razreda za medicinske znanosti
Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti

Slavko Cvetnić, Ivo Čikeš, Dragan Dekaris, Vida Demarin,
Vladimir Goldner, Drago Ikić, Ivica Kostović, Zvonko Kusić,
Josip Madić, Davor Miličić, Marko Pećina, Ivan Prpić,
Željko Reiner, Daniel Rukavina, Marko Šarić,
Zdenko Škrabalo, Eugen Topolnik, Teodor Wikerhauser

Organizacijski odbor

Slavko Cvetnić, Željko Cvetnić,
Đuro Huber, Mirko Lojkić, Josip Madić,
Eugen Topolnik, Teodor Wikerhauser