

Utjecaj različitih metoda obrade ribljih proizvoda na cjelovitost i čistoću izolirane DNA iz oblića roda *Anisakis*

Odžak, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:226:310307>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of University Department of Marine Studies](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

Kristina Odžak

**UTJECAJ RAZLIČITIH METODA OBRADE RIBLJIH
PROIZVODA NA CJELOVITOST I ČISTOĆU
IZOLIRANE DNA IZ OBLIĆA RODA *ANISAKIS***

Diplomski rad

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
DIPLOMSKI STUDIJ MORSKO RIBARSTVO

**UTJECAJ RAZLIČITIH METODA OBRADJE RIBLJIH
PROIZVODA NA CJELOVITOST I ČISTOĆU
IZOLIRANE DNA IZ OBLIČA RODA *ANISAKIS***

Diplomski rad

Predmet: Biotehnologija i genetika u ribarstvu i akvakulturi

Mentor:

Doc. dr. sc. Željka Trumbić

Student:

Kristina Odžak

Split, rujan 2018.

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Diplomski studij Morsko ribarstvo

Diplomski rad

UTJECAJ RAZLIČITIH METODA OBRADE RIBLJIH PROIZVODA NA CJELOVITOST I ČISTOĆU IZOLIRANE DNA IZ OBLIĆA RODA *ANISAKIS*

Kristina Odžak

Sažetak

Anisakijaza je zoonoza od sve većeg javnozdravstvenog značaja koju uzrokuju oblici iz roda *Anisakis* prilikom penetracije u sluznicu želuca i crijeva kod ljudi. Simptomi uključuju mučninu, srednje do jaku bol u trbuhu, povraćanje i alergijske reakcije. Oblici roda *Anisakis* spp. prolaze kroz razvojne stadije parazitirajući u probavnom sustavu morskih riba i sisavaca. Ličinka 3. stupnja može zaraziti čovjeka kao slučajnog domaćina prilikom konzumacije sirove ili nedovoljno termički obrađene ribe ili glavonožaca. *Anisakis simplex* (s.s.) i *A. pegreffii* su najčešći uzročnici ove bolesti kod ljudi čije ličinke nije moguće morfološki razlikovati stoga se koriste molekularne metode. U ovom su radu simulirane različite metode obrade proizvoda ribarstva: kuhanje (15 min na 60°C i 80°C), soljenje (rasol 21% NaCl), mariniranje (10% octena kiselina i 3% NaCl) i sterilizacija (autoklavom na 113°C) te praćen njihov utjecaj na cjelovitost, koncentraciju i čistoću izolirane DNA iz ličinki oblića *A. pegreffii* i uspješnost primjene molekularnih metoda za determinaciju vrsta ovog roda na takvoj DNA. Od svih postupaka, degradacija kvalitete izolirane DNA je uočena prilikom postupka termičke obrade uz korištenje autoklava što je utjecalo i na lošu uspješnost PCR amplifikacije molekularnih biljega u ovoj skupini.

(35 stranica, 12 slika, 5 tablica, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Anisakis*, određivanje vrste, soljenje, mariniranje, kuhanje, sterilizacija, DNA

Mentor: Doc. dr. sc. Željka Trumbić

Ocjenjivači: 1. Doc. dr. sc. Maja Krželj
2. Doc. dr. sc. Željka Trumbić
3. Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat

EFFECT OF DIFFERENT FISH PROCESSING METHODS ON INTEGRITY AND PURITY OF ISOLATED DNA FROM *ANISAKIS* SPP

Kristina Odžak

Abstract

Anisakiasis is a zoonoses with increasing public health importance caused by the nematodes of genus *Anisakis* when penetrating the stomach and intestines in humans. The symptoms include nausea, moderate to severe abdominal pain, vomiting and allergic reactions. *Anisakis* spp. go through several developmental stages while invading the digestive system of marine fish and mammals. Human can act as accidental hosts to third stage *Anisakis* larvae if raw or undercooked fish or cephalopods are ingested. *Anisakis simplex* (s.s.) and *A. pegreffii* are the most common species causing anisakiasis in humans whose larvae cannot be morphologically differentiated and molecular methods are used. In this study, the effect of different fish processing methods: cooking (15 min at 60°C and 80°C), salting (brine 21% NaCl), marinating (10% acetic acid, 3% NaCl) and sterilization (using autoclave at 113°C) on the integrity, concentration and purity of extracted DNA from *A. pegreffii* larvae and the success rate of the application of molecular methods for species identification of this genus was investigated. The degradation of the quality of extracted DNA was observed only in the case of sterilization which also had a deleterious effect on the success of PCR amplification of molecular markers in this group.

(35 pages, 12 figures, 5 tables, 43 references, original in: Croatian)

Keywords: *Anisakis*, species determination, salting, marinating, cooking, sterilization, DNA

Supervisor: Željka Trumbić, PhD / Assistant Professor

Reviewers:

1. Maja Krželj, PhD / Assistant Professor
2. Željka Trumbić, PhD / Assistant Professor
3. Vida Šimat, PhD / Associate Professor

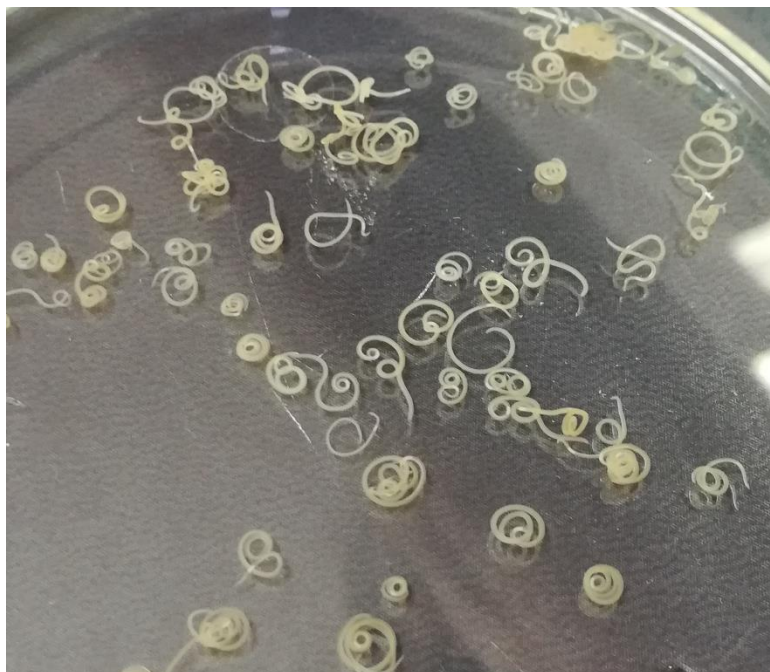
SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. <i>Anisakis</i> spp.	1
1.2. Životni ciklus	2
1.3. <i>Anisakis</i> spp. u ribljim vrstama u Sredozemnom moru	4
1.4. <i>Anisakis</i> spp. kod ljudi	7
1.5. Zakonska regulativa	8
1.6. Identifikacija ličinki roda <i>Anisakis</i> korištenjem molekularnih metoda	9
1.7. Dosadašnja istraživanja	11
1.8. Svrha i ciljevi rada	14
2. MATERIJALI I METODE	15
2.1. Uzorkovanje <i>Anisakis</i> spp. ličinki	15
2.2. Metode obrade ribljih proizvoda primijenjene na ličinkama L3 roda <i>Anisakis</i>	15
2.3. Optimizacija izolacije genomske DNA	18
2.4. Izolacija genomske DNA iz ličinki oblića <i>Anisakis</i> spp.	19
2.5. Provjera koncentracije, čistoće i cjelovitosti izolirane DNA	20
2.6. Molekularna identifikacija ličinki	22
3. REZULTATI I RASPRAVA	24
3.1. Kvaliteta izolirane DNA nakon različitih metoda obrade ribljih proizvoda	24
3.2. Uspješnost PCR reakcije i metoda molekularne identifikacije	28
4. ZAKLJUČCI	31
5. LITERATURA	32

1. UVOD

1.1. *Anisakis* spp.

Francuski biolog Felix Dujardin je 1845. godine u svojoj knjizi *Histoire naturelle des helminthes ou vers intestinaux* opisao novi rod *Anisakis* (Dujardin, 1845). Oblici roda *Anisakis* (Slika 1.) pripadaju porodici Anisakidae i parazitiraju u velikom broju prvenstveno morskih vrsta. Uzročnici su zoonoza, tj. bolesti zajedničkih ljudima i pojedinim životinjskim vrstama.



Slika 1. Ličinke trećeg stadija (L3) oblića roda *Anisakis*.

Bolest koju ovi oblici uzrokuju zove se anisakidoza i prvi put je evidentirana 1950. godine u Nizozemskoj kod pacijenta koji je konzumirao sirovu haringu (Thiel, 1962). Ljudi obolijevaju od anisakidoze prilikom konzumacije sirove ili nedovoljno termički obrađene morske hrane u kojoj je prisutna živa infektivna ličinka trećeg stadija (L3) roda *Anisakis*. Nakon 1960-ih godina prijavljen je veći broj slučajeva ove bolesti u zemljama gdje je konzumacija sirove ribe česta (EFSA, 2010). Kasnije je revidirana terminologija i od 1988. se termin anisakidoza koristi za bolest koja je uzrokovana bilo kojim članom iz porodice Anisakidae, a anisakijaza za bolest koja je uzrokovana specifično članovima roda *Anisakis*

(Audicana i Kennedy, 2008). Taksonomija roda *Anisakis* je prikazana u Tablici 1. gdje možemo vidjeti i ostalih devet, do sada poznatih vrsta, ovog roda.

Tablica 1. Taksonomija roda *Anisakis* (izvor:

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=22832>).

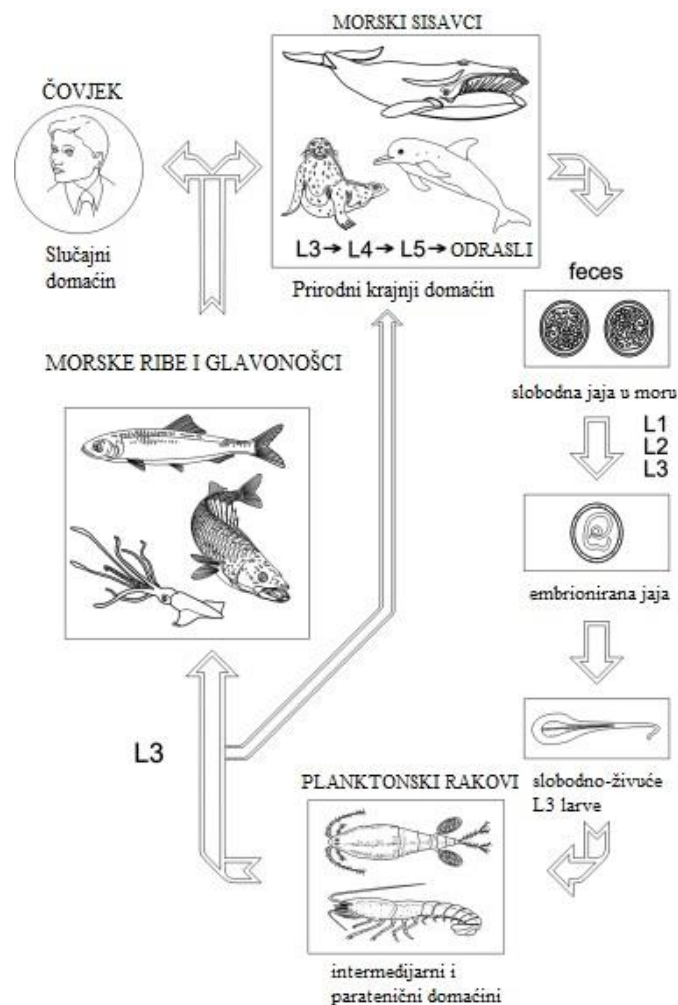
Carstvo	<i>Animalia</i>	
Koljeno	<i>Nematoda</i>	
Razred	<i>Secernentea</i>	
Red	<i>Ascaridida</i>	
Porodica	<i>Anisakidae</i>	
Rod	<i>Anisakis</i> Dujardin, 1845	
Vrsta	I grupa	<i>Anisakis simplex</i> (sensu stricto), <i>A. berlandi</i> , <i>A. pegreffii</i> , <i>A. typica</i> , <i>A. ziphidarum</i> , <i>A. nascetti</i>
	II grupa	<i>A. physeteris</i> , <i>A. brevispiculata</i> , <i>A. paggiae</i>

1.2. Životni ciklus

Nametnici roda *Anisakis* parazitiraju u probavnom sustavu morskih organizama te kao i ostali oblici prolaze kroz različite razvojne stadije. Njihov složeni životni ciklus uključuje intermedijarne, paratenične i krajnje domaćine (Slika 2.). Odrasle jedinke *Anisakis* spp. se najčešće nalaze u želucu morskih sisavaca. Nakon kopulacije, ženke proizvode neembrionirana jaja koja se fecesom izbacuju u vanjsku sredinu gdje započinje embriogeneza. Ovisno o lokalnim strujanjima i temperaturi, jaja prije izvaljenja mogu potonuti na morsko dno (Smith i Wootten, 1978). Embrionalnim razvojem nastaje ličinka koja prolazi kroz četiri presvlačenja. Opće je prihvaćeno da se u jaju ličinka razvija do drugog (L2) stupnja, dok L4 i odrasle jedinke nastaju u krajnjim domaćinima (Smith i Wootten, 1978). Međutim, nije potpuno razjašnjeno kada točno dolazi do drugog presvlačenja, odnosno nastanka infektivne L3 ličinke (Slika 2.). Među znanstvenicima postoje različita mišljenja o tome; od toga da se događa već u jajašcu, planktonskim račićima, najčešće eufauzidima koji služe kao intermedijalni domaćini, ili čak u ribi (vidi raspravu u Hays i sur., 1998). Hays i sur. (1998)

su proučavajući zajednice eufauzida estuarija rijeke St. Lawrence u Kanadi pronašli i ličinke drugog stupnja u fazi presvlačenja, kao i ličinke trećeg stupnja u eufauzidima te zaključili da eufauzidi moraju biti intermedijarni domaćini u kojima dolazi do drugog presvlačenja. Druge studije prijavljuju nalaze isključivo L3 u eufauzidima (Gómez-Gutiérrez i sur., 2010; Gregori i sur., 2015) i daju im više ulogu parateničnih domaćina u kojima ne dolazi do drugog presvlačenja koje se, prema nekim dokazima, događa još u jajašcu (Smith i Wootten, 1978). U svakom slučaju, činjenica je da su L3 ličinke pronađene kod eufauzida širom svijeta što upućuje na to da račić ima značajnu ulogu u propagaciji stadija *Anisakis* spp. kroz trofičku mrežu do krajnjih domaćina (Hays i sur., 1998; Gómez-Gutiérrez i sur., 2010; Gregori i sur., 2015).

Infektivni L3 do krajnjeg domaćina (morskih sisavaca) dolazi ingestijom zaražene ribe ili glavonožaca koji su prethodno pojeli inficiranog račića i/ili direktno ingestijom inficiranih račića (kitovi). Želučani sokovi krajnjih domaćina pokreću presvlačenje ličinke iz L3 u L4 (ličinku četvrtog stupnja). Nakon presvlačenja, ličinka se pričvrsti za sluznicu želuca i raste do adultnog oblika. Kada adultni oblici dosegnu spolnu zrelost, razmnožavaju se u želucu domaćina i otpuštaju jaja završavajući ciklus. Čovjek konzumacijom zaražene sirove ili nedovoljno termički obrađene morske hrane može postati slučajni domaćin u kojem se L3 aktivira, ali se ne uspijeva razviti u adulta, ili se to događa iznimno rijetko (Audicana i Kennedy, 2008). Trenutno je prepoznato devet vrsta roda *Anisakis*, od kojih su najčešći uzročnici infekcija kod ljudi *A. simplex* sensu stricto (s.s.) i *A. pegreffii* (Mattiucci i sur., 2018).



Slika 2. Životni ciklus oblića roda *Anisakis* (izvor: Audicana i Kennedy, 2008.).

1.3. *Anisakis* spp. u ribljim vrstama u Sredozemnom moru

Sredozemno more uz Crno more spada u ribolovnu FAO zonu 37, važno područje komercijalnog ribolova. Od približno 700 vrsta riba koje nastanjuju Sredozemno more (Froese i Pauly, 2019), čak je 100 komercijalnih i od velike gospodarske važnosti. U Tablici 2., prikazane su riblje vrste Sredozemnog mora u kojima je pronađena ličinka trećeg stupnja vrsta *A. simplex* (s.s.) i/ili *A. pegreffii*. Ljudi svakodnevno konzumiraju ribu ne pridodajući puno pažnje opasnostima koje su moguće ukoliko zaraženu ribu/glavonošca ne obradimo na ispravan način. Prema Tablici 2., najrizičnije vrste riba su oslić *Merluccius merluccius*, šarun *Trachurus trachurus* i skuša *Scomber scombrus*, ali i srdela *Sardina pilchardus* i inćun *Engraulis encrasicolus*. Posljednje dvije su posebno važne obzirom da se u tradicionalnoj mediteranskoj prehrani često konzumiraju u obliku mariniranih ili soljenih proizvoda, a koji

su povezani s pojavom anisakijaze kod ljudi (EFSA, 2010; Molina-Fernández i sur., 2015; Bao i sur., 2017). Najizloženije vrste kod glavonožaca su mali lignjun *Illex coindetii* i veliki lignjun *Todarodes sagittatus*, a kod krajnjih domaćina to su prugasti dupin *Stenella coeruleoalba* i dobri dupin *Tursiops truncatus*. Osim *A. simplex* (s.s.) i *A. pegreffii*, u Mediteranu su zabilježeni i *A. physeteris*, *A. typica* i *A. ziphidarum* (Mattiucci i sur., 2018).

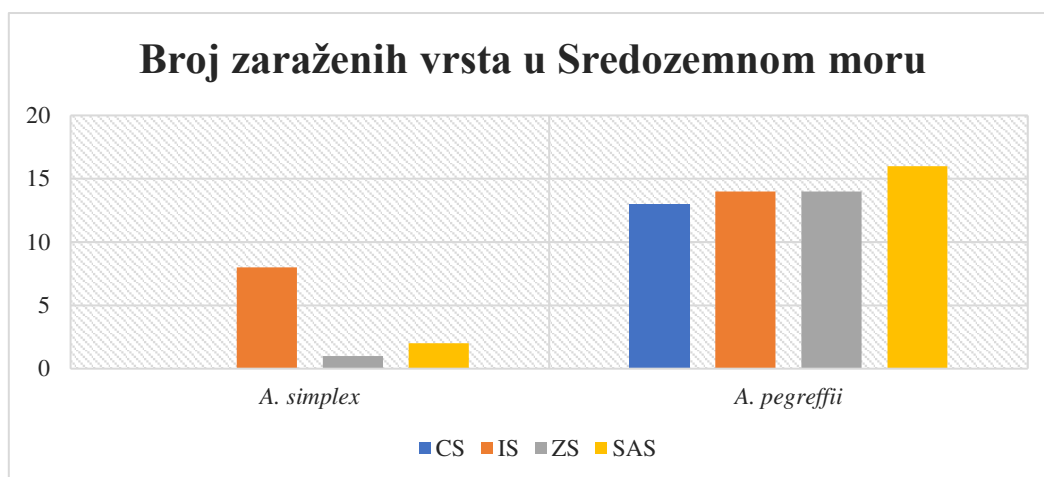
Tablica 2. Do sada utvrđeni krajnji i intermedijarni/paratenični domaćini oblića *A. simplex* (s.s.) i *A. pegreffii* u Sredozemnom moru korištenjem molekularnih biljega (prema Mattiucci i sur., 2018).

			<i>A. simplex</i> (s.s.)	<i>A. pegreffii</i>
KONAČNI DOMAĆINI	Delphinidae	<i>Grampus griseus</i>	/	IS
	Phocoenidae	<i>Stenella coeruleoalba</i>	IS	IS
		<i>Tursiops truncatus</i>	IS	IS, CS
	Ziphiidae	<i>Ziphius cavirostris</i>	/	IS
INTERMEJARNI/PARATENIČNI DOMAĆINI	Ommastrephidae	<i>Illex coindetii</i>	/	ZS
		<i>Todarodes sagittatus</i>	/	SAS
	Carangidae	<i>Trachurus mediterraneus</i>	/	CS, ZS
		<i>Trachurus picturatus</i>	/	ZS
		<i>Trachurus trachurus</i>	IS, ZS	CS, IS, SAS, ZS
	Centracanthidae	<i>Spicara smaris</i>	/	IS
	Clupeidae	<i>Sardina pilchardus</i>	/	IS, ZS
	Congridae	<i>Conger conger</i>	/	CS
	Coryphaenidae	<i>Coryphaena hippurus</i>	IS	/
	Engraulidae	<i>Engraulis encrasicolus</i>	/	CS, IS, ZS
	Gadidae	<i>Micromesistius poutassou</i>	/	CS, IS, SAS, ZS
	Lophiidae	<i>Lophius piscatorius</i>		IS, SAS, ZS
	Merluccidae	<i>Merluccius merluccius</i>	SAS	CS, IS, SAS, ZS
	Muraenidae	<i>Muraena helena</i>	/	SAS
	Phycidae	<i>Phycis blennoides</i>	/	SAS
		<i>Phycis phycis</i>	/	SAS
	Schophtalmidae	<i>Lepidorhombus boscii</i>	/	SAS
	Scombridae	<i>Euthynnus alletteratus</i>	IS	/

		<i>Scomber japonicus</i>	/	IS, SAS, ZS
		<i>Scomber scombrus</i>	IS, SAS	CS, IS, SAS, ZS
		<i>Thunnus thynnus</i>	IS	CS, SAS
	Sebastidae	<i>Helicolenus datylopterus</i>	/	CS
	Sparidae	<i>Diplodus annularis</i>	/	IS
	Trachichthyidae	<i>Hoplostethus mediterraneus</i>	/	CS
	Trachinidae	<i>Echiichtys vipera</i>	/	SAS
		<i>Trachinus draco</i>	/	SAS
	Trichiuridae	<i>Lepidopus caudatus</i>	/	CS, ZS
		<i>Trichiurus lepturus</i>	/	SAS
	Triglidae	<i>Mullus barbatus</i>	IS	/
		<i>Mullus surmuletus</i>	/	ZS
	Xiphiidae	<i>Xiphias gladius</i>	/	CS, SAS
	Zeidae	<i>Zeus faber</i>	/	ZS

IS – istočno Sredozemno more, CS – centralno Sredozemno more, ZS – zapadno Sredozemno more, SAS – sjeverno-afričko Sredozemno more

Na Slici 3. je prikazana raznolikost (broj) vrsta inficiranih oblicem *A. pegreffii* i *A. simplex* (s.s.) u Sredozemnom moru. *A. pegreffii* je dominantna vrsta roda *Anisakis* prisutna u Sredozemnom moru gdje inficira različite pelagične i pridnene vrste riba (Tablica 2.; vidi reference u Mattiucci i sur., 2018). Ima široku geografsku distribuciju, a smatra se da je u Atlantiku rasprostranjen do Pirenejskog poluotoka gdje se simpatrijski preklapa s *A. simplex* (s.s.). Za razliku od *A. pegreffii*, *A. simplex* je borealna vrsta koja životni ciklus zatvara u subarktičkim i umjerenim vodama sjeverne hemisfere. U Sredozemnom moru je zabilježen u Alboranskom moru, uz rijetke nalaze iz istočnog Sredozemnog bazena za koje se smatra da su povezani s izrazito migratornim ponašanjem krajnjih (prugasti i dobri dupin) i parateničnih domaćina (npr. atlantska plavoperajna tuna *Thunnus thynnus*) (Blažeković i sur., 2015; Mladineo i sur., 2017; Mattiucci i sur., 2018).



Slika 3. Grafički prikaz broja vrsta u Sredozemnom moru zaraženih nametnicima *A. simplex* (s.s.) i *A. pegreffii*. IS – istočno Sredozemno more, CS – centralno Sredozemno more, ZS – zapadno Sredozemno more, SAS – sjeverno-afričko Sredozemno more (prema: Mattiucci i sur., 2008).

1.4. *Anisakis* spp. kod ljudi

Konzumacijom sirove, dimljene, marinirane ili nedovoljno kuhane zaražene ribe ili glavonožaca ljudi postaju slučajni domaćini ovih parazita i tako obolijevaju od anisakijaze. Prijavljenih slučajeva ove bolesti je više u zemljama gdje je konzumacija morske hrane češća. Anisakijaza je do sada zabilježena u Nizozemskoj, Japanu, Velikoj Britaniji, Španjolskoj, Havajima, Filipinima, Danskoj, Hrvatskoj (Audicana i Kennedy, 2008; EFSA, 2010; Mladineo i sur., 2015; Bao i sur., 2017; Cavallero i sur., 2018). Osim slavnog sushija i sashimija u Japanu, visokorizična jela uključuju slanu i dimljenu haringu u Nizozemskoj, skandinavski gravlaks, havajski lomi-lomi, južnoamerički *ceviche*, španjolski *boquerones en vinagre* te talijanski *alici marinate* ili marinirane incune. Ličinke koje su ingestijom unesene u tijelo proizvest će zoonotsku infekciju (Audicana and Kennedy, 2008). Prema Audicana i sur. (2003), anisakidoza kod ljudi može poprimiti četiri oblika, ovisno o kliničkim simptomima i mjestu penetracije te lokalizaciji žive ili uginule ličinke. Možemo razlikovati alergijsku, želučanu, crijevnu i ektopičnu (izvangastrointestinalnu) anisakidozu. Želučano oboljenje nastaje nakon penetracije ličinke u sluznicu želuca te se simptomi poput mučnine, povraćanja, dijareje, vrućice, hematemeze pojavljuju nekoliko sati nakon ingestije zaražene morske hrane. Crijevno oboljenje prate simptomi u periodu od 24 do 48 sati nakon ingestije larve. Simptomi su abdominalna bol, mučnina, povraćanje, opstipacija ili dijareja. U određenim situacijama

Anisakis ličinke mogu prodrijeti kroz cijeli gastrointestinalni zid, penetrirajući čak u organe i tkiva kada nastupa ektopična anisakijaza (Audicana i sur., 2003; Hochberg i Hamer, 2010). Osim ovih simptoma, istovremeno se mogu pojaviti i alergijske reakcije na žive, ali i mrtve nametnike, što se može manifestirati kao urtikarija, angioedem ili čak anafilaktički šok (Audicana and Kennedy, 2008). U najtežim slučajevima moguć je i smrtni ishod. Međutim, moguće je i da kontakt s *Anisakis* ličinkom prođe potpuno asimptomatski te su Moneo i sur. (2017) predložili da se ovakvi slučajevi kod kojih nedostaje klinička slika bolesti, a došlo je do imunološke senzibilizacije pacijenta, vode kao peti oblik anisakijaze.

Ukoliko pacijent pokazuje gastrointestinalne simptome, a konzumirao je sirovu ili termički slabo obrađenu ribu ili glavonošce, uputno je posumnjati na anisakijazu. Dijagnoza se najčešće postavlja endoskopijom ako se ličinka nalazi na vidljivom mjestu. Najučinkovitije liječenje je uklanjanje ličinki za vrijeme same endoskopije nakon čega simptomi nestaju u roku od nekoliko sati. Ukoliko ličinka nije lako dostupna za odstranjivanje, laparotomija i recesija zahvaćenog dijela mogu biti potrebne uz histopatološku analizu (Audicana i sur., 2003). Ličinke roda *Anisakis* u načelu pokazuju otpornost na terapiju anthelminticima, iako se albendazol pokazao uspješnim u nekim slučajevima (Hochberg i Hamer, 2010). Uz vizualne metode, koriste se i serodijagnostički testovi kako bi se potvrdila dijagnoza ako su ličinke već migrirale izvan gastrointestinalnog sustava, nisu vidljive ili su uništene. Alergijska reakcija se treba liječiti na isti način kao i druge anafilaktičke reakcije (Audicana i sur., 2003).

1.5. Zakonska regulativa

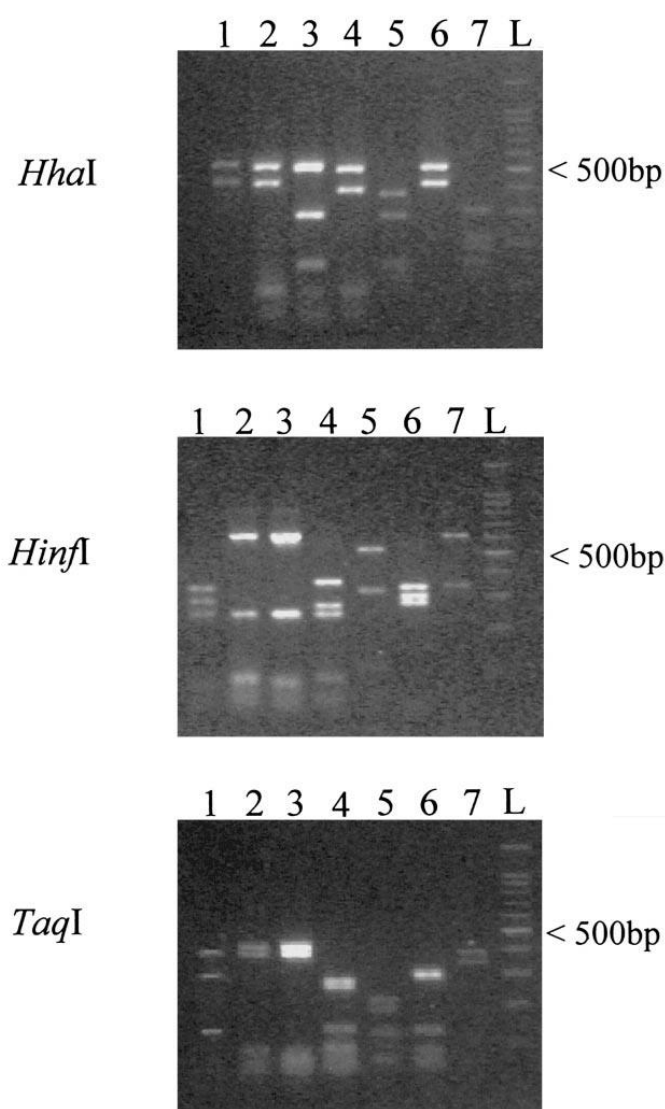
Hrvatsko Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva, na temelju Zakona o morskom ribarstvu, 2006. godine donosi Pravilnik o uvjetima i načinu stavljanja u promet riba i drugih morskih organizama. U pravilniku je naznačeno kako promet ribe uključuje uvoz i izvoz ribe te da ribe mogu biti stavljene u promet ukoliko udovoljavaju propisima o kakvoći, deklariranju i označavanju hrane te veterinarsko-zdravstvenoj ispravnosti (Pravilnik o uvjetima i načinu stavljanja u promet riba i drugih morskih organizama, 2006). Kasnije, 2011. godine, donesen je Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla koji, po uzoru na regulativu Europske Unije EC 853/2004 i 1276/2011, naglašava postupke skladištenja proizvoda ribarstva kako bi se poboljšala njegova ispravnost. Postupci skladištenja podrazumijevaju smrzavanje proizvoda kroz najmanje 24 sata na temperaturi ne višoj od -20°C u svim dijelovima proizvoda i uključuju proizvode ribarstva koji se

konzumiraju sirovi ili gotovo sirovi, proizvode ribarstva poput haringe, skuše, papaline i (divljeg) lososa iz Atlantskog ili Tihog oceana koji se podvrgavaju postupku dimljenja te marinirane i/ili soljene proizvode ribarstva ako postupak prerade nije dostatan za uništavanje ličinki (Pravilnik o izmjenama Pravilnika o higijeni hrane životinjskog podrijetla, 2011). Također je važno, i propisano pravilnikom, da je proizvode ribarstva potrebno vizualno pregledati kako bi se prije njihovog stavljanja na tržište otkrili vidljivi paraziti te ukoliko su proizvodi vidljivo invadirani nametnicima, ne smije ih se staviti na tržište za ljudsku uporabu.

1.6. Identifikacija ličinki roda *Anisakis* korištenjem molekularnih metoda

Točna identifikacija nametnika roda *Anisakis* je ključna za razumijevanje njihove distribucije i epidemiologije, kao i zoonotičnog potencijala kod ljudi (Mattiucci i sur., 2018; 2019). Kod ove skupine oblića učestala je pojava konvergentne evolucije zbog čega morfološka promjena ne mora nužno pratiti specijaciju te je determinacija vrsta temeljem samo morfoloških karakteristika otežana i onemogućena kod određenih stadija i vrsta. Tako su unutar morfovrspe *A. simplex* sensu lato utvrđene tri vrste: *A. simplex* s.s., *A. pegreffii* i *A. berlandi* (Mattiucci i sur., 2014). U postupku određivanja i klasifikacije vrsta ključnu ulogu su imali molekularni biljezi kojima se analizira raznolikost na razini makromolekula, proteina ili DNA. Kao i kod ostalih oblića, multilokusna alozimska elektroforeza, kojom se analizira prisutnost različitih alelnih formi proteina u skupini organizama, se pokazala jako korisnom i uspješnom u detekciji i definiciji kritičnih vrsta unutar roda *Anisakis*, kao i procjeni genetičke diferencijacije, varijabilnosti te hibridizacije između srodnih vrsta (Mattiucci i sur., 2014; 2018). Iako omogućava analizu velikog broja uzoraka, zahtjeva svježi ili smrznuti materijal što nije uvijek dostupno u slučaju ovih nametnika. U novije vrijeme više se koriste molekularne metode koje se temelje na amplifikaciji specifičnog dijela genoma lančanom reakcijom polimeraze (PCR, od eng. *polymerase chain reaction*) i analizi varijabilnosti nukleotidnog slijeda odabranog fragmenta DNA. D'Amelio i sur. (2000) su razvili PCR-RFLP (RFLP od eng. *restriction fragment length polymorphism*) pristup u kojem se ampikon dijela ribosomske DNA (ITS1-5,8S-ITS2) nastao PCR reakcijom obrađuje različitim restrikcijskim endonukleazama (*HhaI*, *HinfI* i *TaqI*) ili enzimima koji režu DNA molekulu na specifičnim sljedovima nukleotida. S obzirom da se fragmenti DNA podrijetlom od različitih vrsta roda *Anisakis* razlikuju u nukleotidnim sljedovima, nakon analize gel elektroforezom nastaju dijagnostički restrikcijski uzorci specifični za svaku vrstu (Slika 4). D'Amelio i sur. (2000) su

na ovaj način uspjeli razlikovati različite vrste roda *Anisakis*, a u kasnijim studijama metoda je upotrijebljena i za detekciju potencijalnih hibrida između *A. simplex* (s.s.) i *A. pegreffii* (Abollo i sur., 2003). Međutim, drugi autori navode da se ne radi o fiksiranim dijagnostičkim biljezima te da je moguća pogrešna klasifikacija zbog čega je uputno koristiti više molekularnih biljega u isto vrijeme (Mattiucci i sur., 2016).



Slika 4. Različiti uzorci (eng. *bandovi*) nastali digestijom uz pomoć tri restrikcijska enzima (*HhaI*, *HinfI*, *TaqI*) dijela ribosomske DNA (rDNA), koja uključuje ITS-1, 5,8S gen i ITS-2 regiju, kod sedam različitih vrsta roda *Anisakis*. Linije: 1, *A. pegreffii*; 2, *A. simplex* sensu stricto; 3, *A. berlandi*; 4, *A. physeteris*; 5, *A. schupakovi*; 6, *A. ziphidarum*; 7. *A. typica*; L, molekularno ravnalo s razmacima od 100 baznih parova (bp) (izvor: D'Amelio i sur., 2000).

Direktno sekvenciranje dijela mitohondrijske DNA (COI, COII, rrnS), koja prati majčinsko nasljeđivanje, i nuklearne ribosomske DNA uz filogenetsku analizu koja omogućuje rekonstrukciju ancestralnih odnosa, su imali široku primjenu u filogenetici i potvrdi specijacije unutar roda *Anisakis* (Mattiucci i sur., 2008). Nukleotidne promjene na nuklearnom genu EF1 α -1 (elongacijski faktor 1) su također nedavno predložene kao dijagnostički biljeg između vrsta *A. simplex* (s.s.) i *A. pegreffii* (Mattiucci i sur., 2016), a razvijena su i dva panela nuklearnih mikrosatelitnih lokusa, čija će primjena omogućiti opsežnije analize genetske raznolikosti unutar i između populacija, populacijske strukture i demografske povijesti oblića roda *Anisakis* (Mladineo i sur., 2017; Mattiucci i sur., 2019).

1.7. Dosadašnja istraživanja

Prisutnost *Anisakis* ličinki u ribi i ribljim proizvodima predstavlja značajan javnozdravstveni, ali i ekonomski rizik (Audicana i Kennedy, 2008). Osim što ingestija živih ličinki može dovesti do razvoja anisakijaze, izlaganje alergenima ili proteinima podrijetlom od ovih oblića koji zaostaju u ribi i ribljim proizvodima može izazvati kliničke alergijske simptome, a slučajni pronalazak ličinki u hrani, iako inaktivirane termičkom obradom ili smržavanjem, predstavlja izuzetno neugodno iskustvo. *Anisakis* posjeduje brojne proteine koji mogu djelovati kao alergeni, a ujedno su termostabilni i otporni na tretman pepsinom (Caballero i Moneo, 2004; Vidaček i sur., 2010; Fæste i sur., 2015). Alergijska reakcija kod ljudi može biti izazvana i inhalacijom *Anisakis* alergena, zbog čega ribari i radnici koji su u dodiru s morskom hranom spadaju u rizičnu skupinu (Añíbarro i Seoane, 1998; Mladineo i Poljak, 2014). Zabilježen je i slučaj razvoja alergijskih simptoma kod prethodno senzibiliziranih osoba na *Anisakis* antigene uslijed jedenja mesa kokoši čija hrana često sadrži veliki udio ribljeg brašna koje je moglo propagirati rezidue *Anisakis* ličinki (Armentia i sur., 2006). S druge strane, Guardone i sur. (2018) su prijavili pronalazak *Anisakis* ličinki u oko 50% testiranih mariniranih i soljenih proizvoda, uglavnom incuna, na talijanskom tržištu.

Kako bi se smanjio rizik od razvoja anisakijaze, preporučene su obavezne mjere redovne kontrole i testiranja ribe i ribljih proizvoda na prisutnost *Anisakis* ličinki ili njegovih alergena (EFSA, 2010). Vizualna inspekcija je prva i najjednostavnija razina kontrole detekcije nametnika u ribi. Vršiti se u slučaju ručnog ili mehaničkog vađenja utrobe od strane kvalificirane osobe i uključuje „candling“ metodu, tj. provjeru fileta kroz jako svjetlo pri čemu će ličinke biti vidljive ako se nalaze pri površini. Međutim, ova metoda nije potpuno

učinkovita. Metoda hidraulično prešanih fileta koji se nakon zamrzavanja promatraju pod UV svjetlom, pri čemu *Anisakis* ličinke pokazuju fluorescenciju, je pokazala bolje rezultate u odnosu na „candling“ metodu, iako je bitno napomenuti da se kod ove metode fileti oštećuju i teško su iskoristivi za daljnju proizvodnju (EFSA, 2010). Moguće je i razgraditi filete otopinom pepsina ili klorovodične kiseline kako bi se ličinke izolirale i prikupile u potpunosti. U ostale, ne-destruktivne metode spadaju ultrazvuk, X-zrake, elektromagnetizam, magnetometrija, FRET u stvarnom vremenu (od eng. *real time fluorescence resonance energy transfer*), MR i spektroskopija. Iako se koriste sve navedene metode, niti jedna još nije prihvaćena kao internacionalni standard (Mattiucci i sur., 2018).

Osim detekcije čitavih ličinki, razvijene su i metode koje omogućuju detekciju prisutnosti rezidua ličinki *Anisakisa*, i to imunokemijske metode detekcije proteina *Anisakisa* u ribljim proizvodima korištenjem različitih monoklonalnih i poliklonalnih protutijela (Fæste i sur., 2015), kao i metode utemeljene na PCR detekciji DNA ovih nametnika. Detekcija DNA se ne može direktno povezati s prisutnošću proteina koji djeluju kao alergeni, međutim može se koristiti kao komplementarna metoda koja osigurava veću specifičnost i otpornost na vanjske utjecaje i tretmane (Lopez i Pardo, 2010; Fæste i sur. 2015). Fæste i sur. (2015) su korištenjem ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) metode i LCMSMS (eng. *high-resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) detektirali prisutnost *Anisakis* alergena u proizvodima od skuše, haringe, bakalara na norveškom tržištu, iako u maloj količini te u tragovima u ribi namijenjenoj za pripremu sushija i svježem lososu iz uzgoja. Tejada i sur. (2014) su imunohistokemijskom metodom detektirali prisutnost *Anisakis* alergena u mesu tune eksperimentalno izložene ličinkama trećeg stupnja roda *Anisakis* i izložene različitim metodama konzerviranja i obrade visokim temperaturama. Pokazalo se da tretman kuhanjem (radi sterilizacije u industrijskom pogonu) smanjuje antigenost proteina Ani s 4, ali je još prisutan u tragovima (Tejada i sur., 2014). Vidaček i sur. (2010) su slično detektirali alergene u samim ličinkama nakon obrade na visokim temperaturama ($94 \pm 1^\circ\text{C}$, 3 minute), a Solas i sur. (2009) u prethodno smrznutim filetima incuna eksperimentalno izloženima ličinkama i mariniranim u otopini octa (bijeli vinski ocat, voda, sol – 50:50:6, v:v:w). Što se tiče metoda detekcije DNA oblića roda *Anisakis*, Lopez-Pardo i sur. (2010) su razvili probu i početnice specifične za dio mitohondrijskog gena citokrom c oksidaza II (COII) koji omogućavaju detekciju fragmenata *A. simplex*-a korištenjem PCR metode u realnom vremenu (real-time PCR ili qPCR), koja je ujedno kvantitativnog karaktera i omogućava detekciju 1 ličinke u 25 g ribljih proizvoda. Autori su ovom metodom detektirali prisutnost *A. simplex* u većini testiranih proizvoda, posebno visoko procesuiranih kao što su

kroketi, pašteta i konzervirani bakalar, ali i dječjoj hrani s udjelom mesa oslića. Mossali i sur. (2010) su razvili slične probe za detekciju nametnika *Anisakis* spp. i *Pseudoterranova* sp. specifične za dio ribosomske DNA i potvrdili prisutnost *Anisakisa* u različitim procesuiranim ribljim proizvodima, uključujući i dječju hranu. Godínez-González i sur. (2017) su također razvili metodu detekcije korištenjem qPCR metode i SYBR Green sistema detekcije koji ne zahtjeva razvoj specifičnih probi već samo početnica za amplifikaciju dijela DNA. Razvili su početnice specifične za dio mitohondrijske DNA (COII) koje mogu detektirati prisutnost *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* i *A. physeteris* u ribljim proizvodima kao što su riblji štapići, kroketi, gulaš i burgeri. Oko pola proizvoda je pokazalo prisutnost oblića roda *Anisakis*. Od navedenih studija, jedino su Lopez-Pardo i sur. (2010) ciljano istražili ulogu metoda izolacije na kakvoću i kvalitetu izolirane DNA iz *Anisakis* ličinki, dok ostale studije prijavljuju utjecaj različitog matriksa na uspješnost detekcije naknadno dodanih *Anisakis* ličinki u riblje proizvode. Uočeno je da viša razina procesuiranja hrane može otežavati izolaciju DNA i utjecati na uspješnost PCR reakcije (Mossali i sur., 2010), međutim ovaj učinak nije direktno istražen na samim ličinkama.

Tradicionalna priprema mariniranih proizvoda podrazumijeva odlaganje ribe u otopinu vinskog octa i soli, na obično manje od 24 sata, što nije dovoljno za ubijanje ličinki (EFSA, 2010). Zakonska regulativa nalaže obavezno zamrzavanje ribe minimalno 24 sata na -20°C, ako je namijenjena pripremi koja ne uključuje termičku obradu kao što je soljenje i mariniranje, kako bi se ubile potencijalne ličinke. Međutim, ovakva praksa narušava teksturu i organoleptička svojstva finalnih proizvoda zbog čega se ciljano traže metode soljenja i mariniranja koje bi postigle zadovoljavajuću kvalitetu proizvoda i osigurale uništenje potencijalnih nametnika (Sánchez-Monsalvez i sur., 2005; EFSA, 2010; Anastasio i sur., 2016). Za tradicionalno mariniranje, Danci i Nijemci su koristili octenu kiselinu i hidrogen peroksid koji uspješno uništava ličinke, ali njegova uporaba je sada zabranjena u EU (Sánchez-Monsalvez i sur., 2005). Ovakve metode obrade ribljih proizvoda su automatski agresivnije i pretpostavljaju dužu obradu proizvoda, što može utjecati na izolaciju DNA i mogućnost detekcije *Anisakis* rezidua u proizvodima.

1.8. Svrha i ciljevi rada

Glavna svrha rada je istražiti utjecaj različitih metoda obrade ribljih proizvoda koje ne uključuju prethodno zamrzavanje (kuhanje, soljenje, mariniranje, sterilizacija) na cjelovitost, čistoću i kvalitetu izolirane DNA iz oblića roda *Anisakis*. Specifični ciljevi rada su: i) simulirati tehnološke postupke na izoliranim ličinkama oblića roda *Anisakis*; ii) izolirati DNA iz tretiranih ličinki; iii) odrediti čistoću i kvalitetu izolirane DNA; iv) istražiti uspješnost primjene molekularnih metoda za identifikaciju vrsta roda *Anisakis* na razini DNA, bez primjene specifičnih proba razvijenih za visoko procesuirane proizvode.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Uzorkovanje *Anisakis* spp. ličinki

Na ribarnici „Brač“ u Splitu kupljena je ugotica pučinka, *Micromesistius poutassou*, zatim prenesena na ledu u prostorije Laboratorija za akvakulturu Instituta za ribarstvo i oceanografiju Split gdje je ribu bilo potrebno otvoriti i ostaviti neko vrijeme kako bi paraziti sami počeli izlaziti, čime se olakšalo njihovo odstranjivanje. Ličinke su isprane u fiziološkoj otopini i čuvane na 4°C do provođenja eksperimenta. Ličinke koje su korištene kao kontrolna skupina su odmah nakon ispiranja sačuvane u 96% etanolu, što je klasična procedura čuvanja uzoraka za DNA izolaciju.

2.2. Metode obrade ribljih proizvoda primijenjene na ličinkama L3 roda *Anisakis*

Za potrebe istraživanja na uzorcima ličinki iz sekcije 2.1. simulirani su uvjeti slijedećih tehnoloških postupaka prerade koji se koriste za proizvode ribarstva:

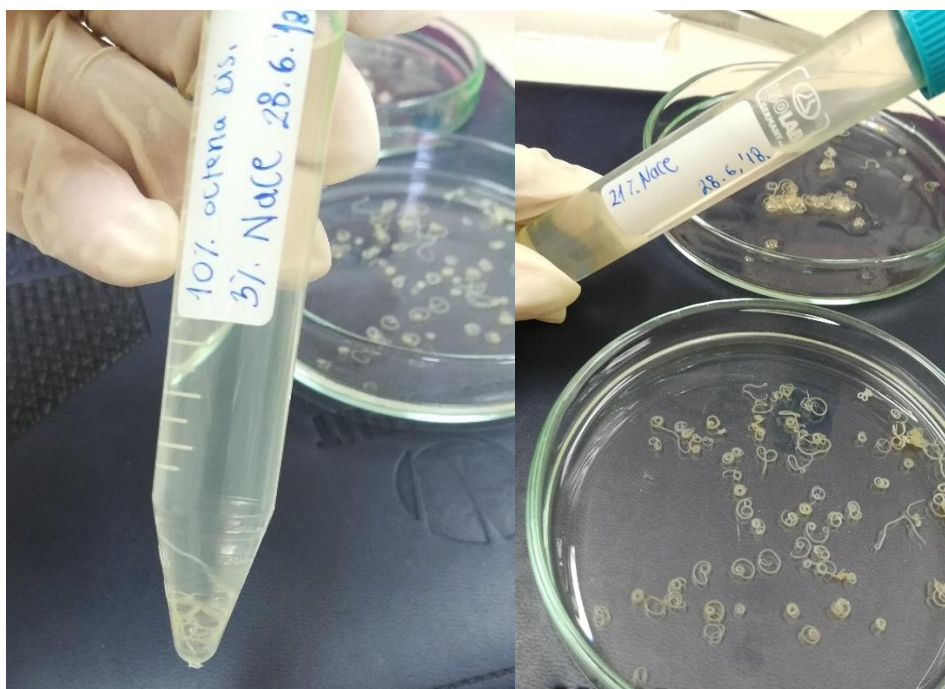
- Mariniranje

Za mariniranje je korištena smjesa 10% octene kiseline (v/v) i 3 % NaCl (w/v). Na 100 mL otopine stavljeno je 10 mL octene kiseline i 3 g NaCl, a volumen postignut vodom (pH = 1,92). U pripremljene tubice dodano je 10 mL otopine za mariniranje i 5 ličinki oblića *Anisakis* spp. (Slika 5.). Tretman je napravljen u triplicatu, na 4°C uz povremeno miješanje tijekom 6 dana. Metoda je preuzeta iz studije u kojoj su autori predložili novu metodu mariniranja svježih incuna (10% octena kiselina, 12% sol na 4°C) koja unutar pet dana učinkovito ubija *Anisakis* ličinke uz koju bi se izbjeglo inicijalno zamrzavanje ribe (Sánchez-Monsalvez i sur., 2005). U istoj studiji ličinke su živjele < 4 dana direktno izložene otopini 10%-tne octene kiseline i 3% soli na 4°C.

- Mokro soljenje

Prema istraživanjima, suho soljenje incuna u kojem udio soli dostiže 21% u svim jestivim dijelovima filea tijekom barem 15 dana (Anastasio i sur., 2016) ili držanje filea bakalara u rasolu od 18,6% tijekom 15 dana (Smaldone i sur., 2017) devitalizira ličinke roda

Anisakis te prethodno zamrzavanje u cilju njihovog uništenja nije potrebno. U ovoj studiji je pripremljena 21% otopina NaCl-a u volumenu od 50 mL vode. U 3 falkon tube od 15 mL dodano je po 5 ličinki i pohranjeno u hladnjak na 4°C (Slika 5.). Ličinke su držane u rasolu tijekom dva mjeseca.



Slika 5. *Anisakis* spp. ličinke u otopini za mariniranje (10% octena kiselina, 3% NaCl) (lijevo) i rasolu (21% NaCl) (desno).

- Termička obrada (kuhanje)

Metoda obrade parazita kuhanjem obavljena je pomoću vodene kupelji. Uvjeti su odabrani prema studiji Vidaček i sur. (2010) u kojoj je utvrđeno da je prethodno preporučena termička obrada *Anisakis* spp. ličinki na 60°C tijekom 10 minuta nedovoljna da ih potpuno inaktivira te nesigurna za potrošače. Za potpunu devitalizaciju je potrebno barem 15 minuta na 60°C ili termička obrada na višim temperaturama (Vidaček i sur., 2010). U ovoj studiji ličinke nametnika su podvrgnute termičkoj obradi tijekom 15 minuta na temperaturi od 60°C i 80°C. Posljednja predstavlja agresivniji i učinkovitiji tretman. U svaku od prethodno pripremljenih 5 mikrotuba s vodom dodane su po 3 ličinke oblića *Anisakis* spp. Tube su zatim premještene u vodenu kupelj. Nakon 15 minuta kuhanja na ciljanoj temperaturi, tube su izvađene iz kupelji te je uočena izrazito bijela boja *Anisakis* spp. ličinki (Slika 6.).



Slika 6. Vodena kupelj i označene tubice s *Anisakis* spp. ličinkama.

- Sterilizacija

Za simulaciju postupka sterilizacije primijenjen je postupak opisan u Tejada i sur. (2014) koji uključuje kombinaciju termičke obrade kuhanjem i autoklaviranjem. Za kuhanje je korištena vodena kupelj. Po tri *Anisakis* spp. ličinke su stavljene u vodu u mikrotube (N=5 replika) i termički obrađene na 80°C tijekom 15 minuta. Iz tubica je nakon kuhanja uklonjena voda i dodano ~1 mL 6% otopine NaCl. Otvorene tube su autoklavirane na 113°C tijekom 40 minuta (Slika 7.).



Slika 7. Tubice s *Anisakis* spp. ličinkama u autoklavu.

Nakon svakog tretmana, ličinke su prebačene u petrijevku s fiziološkom otopinom i promatrane pod lupom. Pod lupom je promatrana moguća vijabilnost ličinki nakon obrade. Na svakom primjerku je uočena oštećena kutikula, što je ujedno bio prvi znak da jedinke nisu preživjele. Osim oštećenja kutikule, na svakoj ličinki su praćeni znakovi gibanja kojih također nije bilo. Zatim su iste ličinke premještene u tubice s 1 mL 96% etanola, označene s odgovarajućim rednim brojevima i oznakama te stavljene u hladnjak na 4°C do daljnje obrade.

2.3. Optimizacija izolacije genomske DNA

Prije izolacije DNA iz svih eksperimentalnih uzoraka, napravljeno je testiranje nekoliko protokola za izolaciju DNA kako bi se utvrdilo koji daje DNA visoke kvalitete, čistoće i koncentracije iz tkiva ličinki *Anisakis* spp. Protokoli su testirani na jedinkama uzorkovanim kao i kontrolna skupina. Uspoređene su metode izolacije DNA korištenjem CTAB (0,1 M Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 0,02 M EDTA, 2% CTAB, 0,2% β-merkaptetanol) i SSTNE (0,3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA-egtazična kiselina, 0,5 mM

spermidin) izolacijskog pufera sa i bez koraka izoljavanja proteina korištenjem 5 M NaCl, prema protokolu prilagođenom iz Turtinen i Juran (1998). Uspoređeno je i vrijeme inkubacije u puferu (4 sata ili preko noći) uz dodatak enzima proteinaze K (4 µL proteinaze K koncentracije 10 mg/mL po uzorku), kao i uključivanje koraka razgradnje RNA korištenjem enzima RNaza. Uz ove metode, testirana je i izolacija DNA korištenjem fenol-kloroform-izoamil alkohol smjese (Sigma-Aldrich) i QIAamp DNA Mini Kit-a (Qiagen) prema uputama proizvođača. Nakon izolacije, spektrofotometrijski su očitavane koncentracije i čistoće DNA, a njena cjelovitost utvrđena je elektroforezom u agaroznom gelu. Zaključeno je da je izolacija korištenjem SSTNE pufera s kratkom inkubacijom (2-3 sata) uz dodatak proteinaze K, uključujući tretman RNazom i bez koraka izoljavanja proteina korištenjem 5 M NaCl dala DNA najboljih karakteristika. Detaljan protokol je opisan u sekciji 2.4.

2.4. Izolacija genomske DNA iz ličinki oblića *Anisakis* spp.

Izolacija DNA je napravljena u tri grupe (svaka grupa jedan dan) i uzorci su bili podijeljeni tako da su u svakoj grupi zastupljeni uzorci svih eksperimentalnih skupina kako bi se izbjegli nasumični učinci zbog dnevnih varijabilnosti u okolišnim uvjetima. U svaku mikrotubicu (Eppendorf) je stavljeno po 200 µL SSTNE izolacijskog pufera, 20 µL 10% SDS-a, 2,5 µL proteinaze K (20 mg/mL) i jedna usitnjena ličinka *Anisakis* spp. Tubice su inkubirane 2 sata na 55°C i 700 rpm u uređaju BioSan Thermo-Shaker TS-100. Nakon 2 sata je povećana temperatura na 70°C dodatnih 15 minuta kako bi se inaktivirala proteinaza K. Nakon što je prošlo 15 minuta, temperatura je smanjena na 37°C i u uzorke dodano 4 µL RNaze A (10 mg/mL, otopljena u vodi i prokuhana 15 min) te su inkubirani 1 sat na 700 rpm. Uzorci su potom centrifugirani u trajanju od 5 minuta na 20°C i 13000 rpm u mikrocentrifugi (Eppendorf Centrifuge 5430 R) kako bi se istaložile nečistoće. Čisti supernatant (200 µL) u kojem se nalazi otopljena DNA je pažljivo pipetiran i prebačen u čistu tubicu. Na to je dodano 250 µL izo-propanola na sobnoj temperaturi i tubice su žustrim pokretima nekoliko puta promiješane i prebačene na led 5 minuta. U sljedećem koraku uzorci su centrifugirani 8 minuta s istim postavkama kao i prije kako bi se izdvojio talog u kojemu se nalazi DNA. Supernatant je odbačen, a ostaci tekućine aspirirani mikropipetom kao bi se prijenos izo-propanola sveo na najmanju moguću mjeru. DNA talog je ispran s 1 mL 70% etanola u hladnjaku na 4°C preko noći (Slika 8.).



Slika 8. DNA izolirana iz ličinki oblića *Anisakis* spp. vidljiva u obliku taloga u tubicama s etanolom.

Nakon inkubacije u hladnjaku na 4°C tijekom noći, tubice su centrifugirane 5 minuta na 13000 rpm te je pipetom uklonjeno 1 mL etanola pazeći da talog ostane netaknut. Višak supernatanta je uklonjen pipetom nakon dodatnog centrifugiranja. Kako bi se talog osušio, tubice su ostavljene otvorene na sobnoj temperaturi. Osušeni talog (kada postane proziran), otopljen je u 20 µL TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8) pufera u hladnjaku na 4°C tijekom 2 sata prije čitanja koncentracije i čistoće na spektrofotometru. Izolirana DNA je zamrznuta na -20°C do daljnjeg korištenja.

2.5. Provjera koncentracije, čistoće i cjelovitosti izolirane DNA

Određivanje čistoće i koncentracije izolirane DNA se napravilo spektrofotometrijski. Prije analize, uzorci su dobro promiješani na vortexu i kapljice oborene kratkom centrifugom kako bi se sadržaj prikupio u dnu tubica. Model spektrofotometara koji je korišten za čitanje koncentracije i čistoće je Jenway Genova Nano (Bibby Scientific, UK). Kao slijepa proba korišten je TE pufer u kojim je otopljena DNA tijekom izolacije.

Cjelovitost izolirane DNA je određena gel elektroforezom. Tijekom gel elektroforeze DNA putuje kroz gel koji služi kao molekularno sito pod djelovanjem strujnog polja te se molekule razdvajaju ovisno o pokretljivosti. Velike molekule će migrirati sporije jer se teže probijaju kroz pore gela. Osim o veličini molekule, brzina kretanja ovisi i o jačini električnog

polja, vrsti i jakosti pufera te o samoj koncentraciji agaroze (Pećina-Šlaus i sur., 2009). Pripremljen je 0,8% gel tako da je u 70 mL 0.5xTAE pufera otopljeno 0,56 g agaroze. Agarozu je otopljena zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici uz povremeno miješanje. Nakon otapanja i kratkog hlađenja, agarozni gel je izliven u elektroforetsku kadu za gel i stavljena su 2 češljica za formiranje jažica (Slika 9.). Hlađenjem se postiže formiranje gela.



Slika 9. Elektroforetska kadica s namještenim češljicima.

Nakon formiranja gela, odstranjeni su češljici i gel je skupa s elektroforetskom kadicom prebačeni u uređaj za provođenje elektroforeze. Na gel je nanešeno 500 ng svakog DNA izolata (1 μ L boje za nanošenje i vizualizaciju uzoraka i 5 μ L vode s pomiješanim uzorkom ovisno o njegovoj koncentraciji). Elektroforeza se provodi u 0,5 x TAE puferu. U prvu jažicu svakog reda pipetom je dodano po 5 μ L markera (4 μ L markera i 1 μ L boje za vizualizaciju i nanošenje uzoraka) i redom su dodani svi uzorci. Elektroforeza je trajala cca. 35 min, na 100 V, 70 mA, 15 vati. Rezultati su vizualizirani pod UV svjetlom na transiluminatoru.

2.6. Molekularna identifikacija ličinki

U svrhu molekularne identifikacije ličinki i provjere uspješnosti izvedbe istih metoda na kalupu DNA izolirane iz ličinki oblića *Anisakis* spp. korištene su metode temeljene na lančanoj reakciji polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), i to amplifikacija dijela mitohondrijskog gena COII, PCR-RFLP metoda prema D'Amelio i sur. (2000), koja pretpostavlja amplifikaciju dijela ribosomske DNA, i amplifikacija mikrosatelitnog lokusa AnisL7 iz Mladineo i sur. (2017). Različiti biljezi su odabrani jer nisu iste veličine, a uspješnost PCR reakcije na razgrađenoj ili nekvalitetnoj DNA može ovisiti o veličini produkta (Pećina-Šlaus i sur., 2009; Lopez i Pardo, 2010).

PCR je molekularna metoda koja omogućava amplifikaciju specifičnog dijela genoma u tubici. PCR zahtijeva određene sastojke poput: DNA kalupa (izolirana DNA, pročišćena od proteina), sintetske oligonukleotide (DNA početnice) koji određuju koji će slijed DNA biti umnožen, dNTP (deoksi nukleozid-trifosfati koji će biti ugrađeni u PCR produkt – dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Taq polimerazu (enzim iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*), specifične puferne i dvovalentne katione (Pećina-Šlaus i sur., 2009). PCR ciklus čine denaturacija, hibridizacija početnica i elongacija. Tijekom denaturacije dolazi do razdvajanja DNA lanaca pri temperaturi od ~90°C. Slijedeći korak je spajanje početnica s komplementarnim dijelom genoma na temperaturi od ~60°C. Zadnji korak, elongacija, uključuje polimerizaciju novih lanaca od mjesta vezivanja početnica pomoću Taq polimeraze.

Za provjeru uspješnosti metoda određivanja vrste *Anisakis* spp. korištenjem PCR-a izdvojeno je ukupno 55 uzoraka, po 9 iz svake eksperimentalne grupe uključujući uzorke s boljom i lošijom DNA, uz 3 negativna kontrolna uzorka (voda umjesto DNA kalupa). Model PCR uređaja koji je korišten je MyCycler Thermal Cycler (Bio-Rad). Reakcije su se sastojale od 1x MyTaq™ HS Red Mix (Bioline, UK) koji uključuje polimerazu, pufer i dNTP, 0,5 µM prednje i stražnje početnice, 1 µL izolirane DNA i sterilne vode do punog volumena. Ukupni reakcijski volumen je iznosio 10 µL za ribosomsku DNA (PCR-RFLP) i 5 µL za COII i AnisL7 lokus. Programi prema kojima se izvela amplifikacija specifičnih dijelova genoma su prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti izvođenja PCR reakcije u svrhu molekularne identifikacije ličinki roda *Anisakis*.

	COII		Ribosomska DNA (ITS)		AnisL7 mikrosatelit	
Vrijeme	Temperatura °C		Temperatura °C		Temperatura °C	
1 minuta	95		95		95	
10 sekundi	95		95		95	
15 sekundi	46	x 35	56	x 35	60	x 30
15 sekundi	72		72		72	
2 minute	72		72		72	

Uspješnost PCR reakcija je provjerena elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu slično kako je već opisano u potpoglavlju 2.5. i rezultati zabilježeni fotokamerom.

Za PCR-RFLP metodu (D'Amelio i sur., 2000) osim PCR reakcije i uspješne amplifikacije dijela ribosomske DNA (ITS1, 5,8S gen, ITS2), potrebno je provesti i razgradnju produkta restrikcijskim enzimima kako bi se otkrili dijagnostičku restrikcijski uzorci specifični za vrstu. U tu svrhu je korišten restrikcijski enzim *HinfI* (Promega, SAD) i pripremljene su reakcije u finalnom volumenu od 20 µL: 0,6 µL restrikcijskog enzima (10 u/µL), 1x pufer za restrikcijski enzim, 0,2 µL acetilirane BSA (Bovine Serum Albumin, 10 µg/µL), 7 µL PCR produkta ribosomske DNA i sterilne vode do završnog volumena. Reakcije su dobro izmiješane i inkubirane 4 sata na 37°C. Rezultati su vizualizirani elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu i zabilježeni fotokamerom.

3. REZULTATI I RASPRAVA

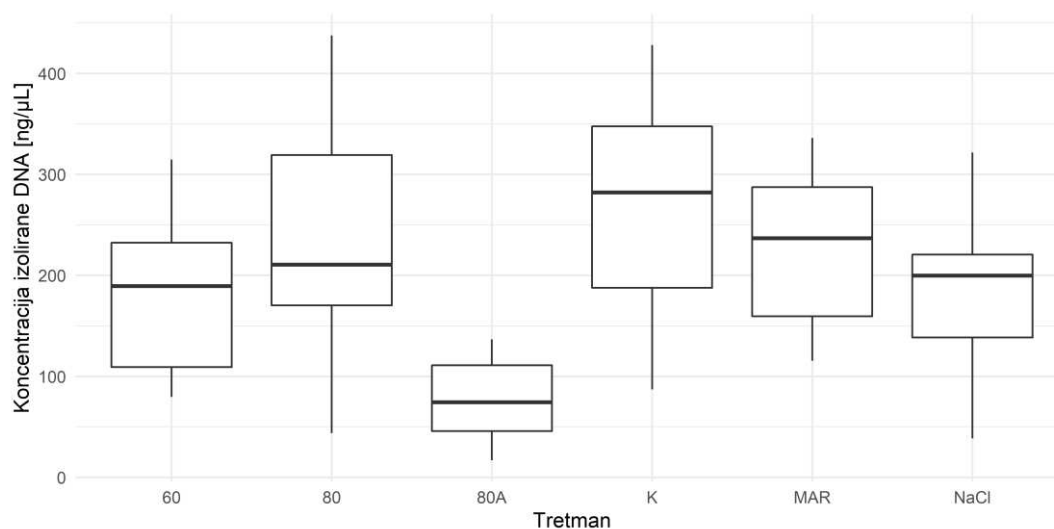
3.1. Kvaliteta izolirane DNA nakon različitih metoda obrade ribljih proizvoda

Rezultati analize izolirane DNA iz L3 ličinki oblića *Anisakis* spp. su sažeto prikazani u Tablici 4. za sve eksperimentalne grupe. Od svih simuliranih metoda koje se koriste za preradu ribe (termička obrada, mariniranje, mokro soljenje, sterilizacija), jedino je sterilizacija ukazala na moguće probleme s kvalitetom izolirane DNA. U toj je skupini zabilježena najmanja koncentracija izolirane DNA (prosječna vrijednost 76,71 ng/ μ L), a od 15 tretiranih uzoraka za pet nije uopće bilo moguće odrediti koncentraciju kao ni čistoću. Najveća prosječna koncentracija izolirane DNA je zabilježena u kontrolnoj skupini (Tablica 4.), iako su u svim skupinama zabilježene varijacije u koncentraciji izolirane DNA (Slika 10.), što je očekivano.

Čistoća izolirane DNA se određuje spektrofotometrijski pri čemu se promatraju omjeri apsorpcije na slijedećim valnim duljinama: A260/A280 i A260/A230. Apsorpcijski maksimum DNA je na 260 nm, a minimum na 230 nm (Plećina-Šlaus i sur., 2009). Apsorpcijski maksimum peptidnih veza u proteinima, fenola, ugljikohidrata je na 230 nm, a aromatskih spojeva na 280 nm. Istaknuti omjeri govore o čistoći izolirane DNA i smatra se da se radi o čistoj DNA ako je A260/A280 oko 1,8, a A260/A230 oko ili više od 2 (Plećina-Šlaus i sur., 2009). U analiziranim uzorcima izolirana je DNA zadovoljavajuće kvalitete što se tiče omjera A260/A280, međutim A260/A230 je bio niži od 1 u svim eksperimentalnim skupinama (Tablica 4). Ovo je bio slučaj za sve protokole izolacije DNA koji su testirani u ovom istraživanju. Lopez i Pardo (2010) nisu prijavili sličan slučaj prilikom testiranja različitih metoda izolacije DNA iz *A. simplex* (s.s.), međutim nisu koristili iste metode izolacije DNA, omjer A260/A230 nije prijavljen dok je A260/A280 bio nešto manji nego u ovom istraživanju. U njihovoj studiji najbolji se pokazao komercijalni kit Wizard DNA Clean-Up System. Smatramo da je uzrok ovako niskog A260/A230 omjera visokomolekularna frakcija trenutno nepoznatog podrijetla koja je vidljiva u jažicama nakon analize DNA gel elektroforezom (Slika 11.). Smatramo da ovo nije imalo učinak na trenutne analize s obzirom da je prisutno i u kontrolnoj skupini, ali u slučaju osjetljivih molekularnih analiza, kao što su npr. moderne metode sekvenciranja, potrebno će biti pronaći optimalni protokol za izolaciju DNA iz *Anisakis* ličinki s obzirom da kontaminacije mogu inhibirati osjetljive enzimске reakcije (Plećina-Šlaus i sur., 2009).

Tablica 4. Broj analiziranih uzoraka ličinki oblića *Anisakis* spp. tretirani različitim metodama obrade ribljih proizvoda, koncentracija izolirane DNA, parametri čistoće izolirane DNA određeni spektrofotometrijom i prisutnost visokomolekularne DNA na agaroznom gelu nakon izolacije. Oznake tretmana: 60, termička obrada na 60°C tijekom 15 minuta; 80, termička obrada na 80°C tijekom 15 minuta; 80A, sterilizacija; K, kontrolna skupina; MAR, mariniranje u 10% octenoj kiselini i 3% NaCl; NaCl, rasol 21% NaCl.

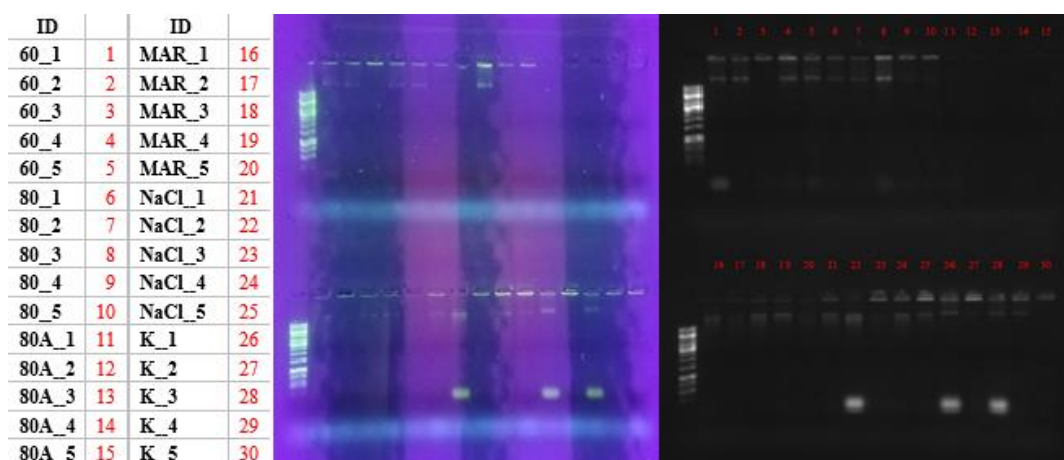
Tretman	Broj analiziranih uzoraka	Koncentracija izolirane DNA [ng/μL] (srednjak ± standardna devijacija)	A260/A280 (srednjak ± standardna devijacija)	A260/A230 (srednjak ± standardna devijacija)	% zastupljenosti visokomolekularne DNA
60	15	179,44 ± 73,48	1,97 ± 0,14	0,89 ± 0,21	87
80	14	233,33 ± 106,35	1,89 ± 0,14	0,75 ± 0,2	93
80A	10	76,71 ± 40,4	1,75 ± 0,09	0,61 ± 0,08	0
K	15	266,57 ± 109,78	1,92 ± 0,12	0,74 ± 0,14	93
MAR	15	227,18 ± 73,62	1,93 ± 0,12	0,78 ± 0,19	93
NaCl	15	178,17 ± 78,3	1,82 ± 0,19	0,67 ± 0,2	93



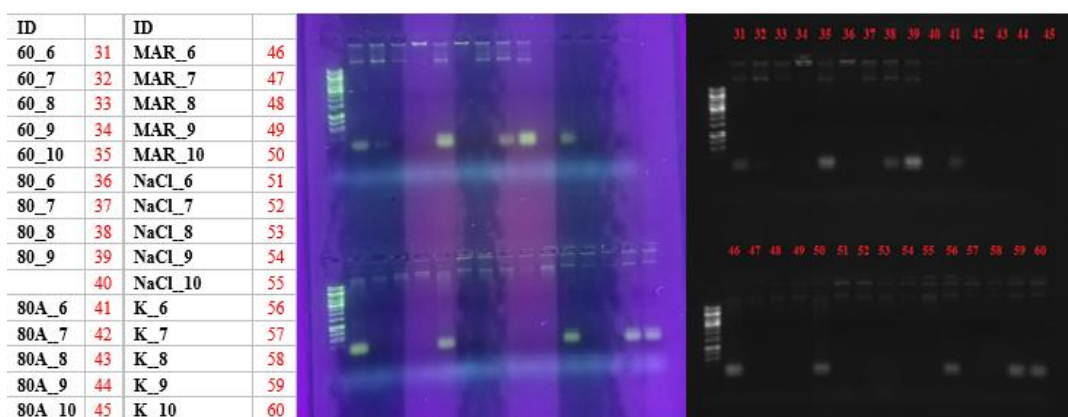
Slika 10. Medijan i raspon zabilježene koncentracije izolirane DNA iz ličinki oblića *Anisakis* spp. tretirani različitim metodama obrade ribljih proizvoda. Oznake tretmana: 60, termička obrada na 60°C tijekom 15 minuta; 80, termička obrada na 80°C tijekom 15 minuta; 80A,

sterilizacija; K, kontrolna skupina; MAR, mariniranje u 10% octenoj kiselini i 3% NaCl; NaCl, rasol 21% NaCl.

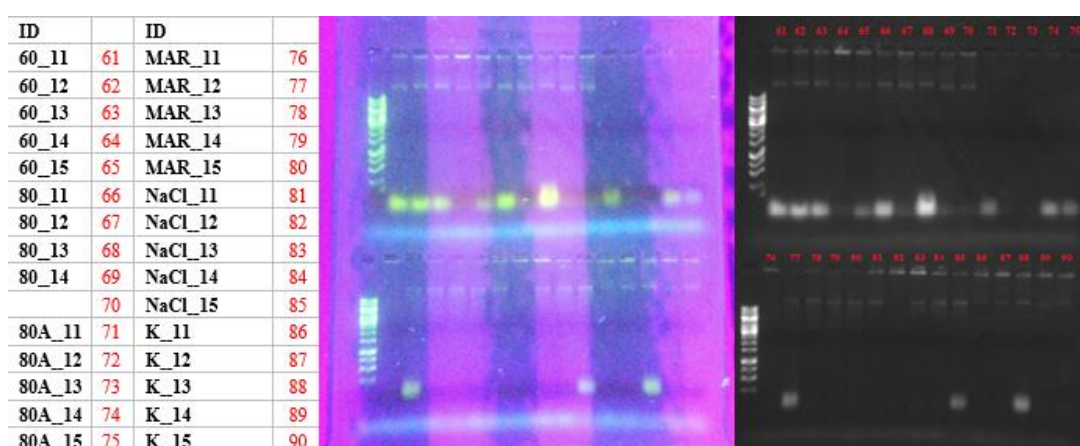
A)



B)



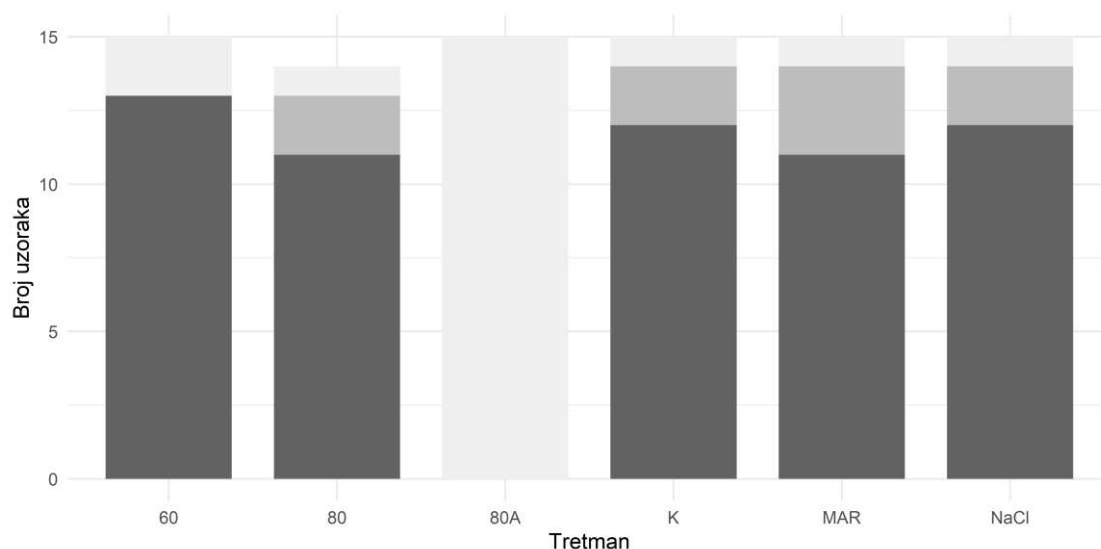
C)



Slika 11. Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu izolirane DNA iz ličinki oblića *Anisakis* spp. tretirani različitim metodama obrade ribljih proizvoda. Oznake: 60_1 – 15, termička obrada 15 minuta na 60°C; 80_1 – 15, termička obrada 15 minuta na 80°C; 80A_1 – 15, sterilizacija; MAR_1 – 10, mariniranje u otopini 10% octena kiselina i 3% NaCl; NaCl_1 –

15, rasol 21% NaCl; K_1 – 15, kontrolna skupina. A) prva grupa, B) druga grupa, C) treća grupa.

Cjelovita DNA, vidljiva kao visokomolekularni band na agaroznom gelu nakon elektroforeze izolirane DNA (Slika 11.), je zabilježena u svim eksperimentalnim skupinama u gotovo 90% izolacija, osim u skupini ličinki koja je prošla sterilizaciju (Tablica 4, Slika 12). U ovoj skupini nijedan uzorak nije imao cjelovitu DNA i ona nije bila vidljiva na gelu (Slika 11). U svim skupinama, osim termičkog tretmana na 60°C tijekom 15 minuta, su zabilježena dva do tri uzorka u kojima je cjelovita DNA bila prisutna, ali slabo vidljiva na gelu (Slika 12). Prisustvo cjelovite DNA osigurava uspješnost daljnjih metoda detekcije koje se temelje na PCR reakciji, no njeno odsustvo ne znači nužno njihovu neuspješnost s obzirom da je za uspješnu PCR reakciju teoretski dovoljna i jedna molekula DNA, posebno ako se radi o manjim produktima koji imaju veću vjerojatnost amplifikacije na fragmentiranoj DNA (Plećina-Šlaus i sur., 2009; Lopez i Pardo, 2010).



Slika 12. Broj uzoraka s visokomolekularnom frakcijom izolirane DNA iz ličinki oblića *Anisakis* spp. tretirani različitim metodama obrade ribljih proizvoda. Oznake tretmana: 60, termička obrada na 60°C tijekom 15 minuta; 80, termička obrada na 80°C tijekom 15 minuta; 80A, sterilizacija; K, kontrolna skupina; MAR, mariniranje u 10% octenoj kiselini i 3% NaCl; NaCl, rasol 21% NaCl. Legenda: tamno siva – visokomolekularna DNA; svijetlosiva – visokomolekularna DNA prisutna na gelu, ali jako slabo vidljiva; svijetla – odsustvo visokomolekularne DNA.

3.2. Uspješnost PCR reakcije i metoda molekularne identifikacije

U ovoj studiji istražen je mogući utjecaj metoda obrade ribljih proizvoda na cjelovitost i čistoću izolirane DNA iz ličinki oblića roda *Anisakis*, što bi moglo utjecati na uspješnost metoda molekularne identifikacije vrste ovog nametnika, a to je od epidemiološkog i dijagnostičkog značaja (Mattiucci i sur., 2018). Testirane su različite metode obrade ribljih proizvoda: za proizvode koji ne prolaze termičku obradu, a koji uspješno uništavaju *Anisakis* ličinke i bez prethodnog zamrzavanja: mariniranje u 10% octenoj kiselini i 3% NaCl tijekom minimalno pet dana (Sánchez-Monsalvez i sur., 2005), mokro soljenje u rasolu s 21% NaCl (Anastasio i sur., 2016; Smaldone i sur., 2017); termička obrada na 60°C i 80°C tijekom 15 minuta (Vidaček i sur., 2010) te sterilizacija simulirana termičkom obradom na 80°C tijekom 15 minuta i naknadnim autoklaviranjem (Tejada i sur., 2014). Od molekularnih metoda identifikacije vrste roda *Anisakis*, odabrane su tri metode koje se temelje na PCR reakciji i amplifikaciji specifičnog dijela genoma: mitohondrijskog gena COII, PCR-RFLP dijela ribosomske DNA (D'Amelio i sur., 2000; Abollo i sur., 2003) te jedan mikrosatelitni lokus kao predstavnik manjih molekularnih biljega (Mladíneo i sur., 2017). Uspješna PCR amplifikacija odabranih biljega je zabilježena u svim eksperimentalnim skupinama, osim kod sterilizacije (Tablica 5). U toj skupini došlo je jedino do amplifikacije najmanjeg biljega, mikrosatelitnog lokusa kod oko trećine testiranih uzoraka, međutim zabilježena je i nespecifična amplifikacija u jednom uzorku kod amplifikacije rDNA (podaci nisu prikazani). U ostalim skupinama uspješnost PCR reakcije je iznosila 100%, osim u skupini termički obrađenoj na 60°C tijekom 15 minuta gdje dio mitohondrijske DNA nije uspješno amplificiran u jednom uzorku koji nije pokazao prisutnost cjelovite DNA, iako u drugom jest. U ostalim skupinama svi su uzorci uspješno amplificirani, bez obzira na prisustvo cjelovite DNA.

Uspješna PCR amplifikacija dijela COII gena i mikrosatelitnog lokusa AnisL7 je uzeta kao znak da bi se ovi produkti mogli koristiti u daljnjim analizama, međutim trenutno to nije napravljeno. U svrhu identifikacije vrste *Anisakis* ličinki napravljena je RFLP analiza dijela amplificirane ribosomske DNA gdje je prema restrikcijskim uzorcima na gelu utvrđeno da se radi o vrsti *A. pegreffii*, dok je hibridni genotip (*A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii*) zabilježen u četiri uzorka. Molekularna identifikacija vrste ovom metodom nije bila moguća u steriliziranim uzorcima.

Tablica 5. Postotak uspješnosti amplifikacije odabranih dijelova genoma *Anisakis* spp. PCR reakcijom na DNA izoliranoj iz ličinki nakon različitih metoda obrade ribljih proizvoda. Oznake tretmana: 60, termička obrada na 60°C tijekom 15 minuta; 80, termička obrada na 80°C tijekom 15 minuta; 80A, sterilizacija; K, kontrolna skupina; MAR, mariniranje u 10% octenoj kiselini i 3% NaCl; NaCl, rasol 21% NaCl. Geni: COII, citokrom oksidaza II; rDNA, ribosomska DNA; AnisL7, mikrosatelit.

Tretman	Broj uzoraka	% PCR (COII)	% PCR (rDNA)	% PCR (AnisL7)
60	9	89	100	100
80	9	100	100	100
80A	9	0	0	33
K	9	100	100	100
MAR	9	100	100	100
NaCl	9	100	100	100

Slično predstavljenim rezultatima, Mossali i sur. (2010) su prijavili problematičnu PCR amplifikaciju eukariotskih i *Anisakis* biljega na procesuiranim uzorcima dječje hrane. Lopez i Pardo (2010) nisu pronašli nikakve probleme s izolacijom DNA ili PCR amplifikacijom iz različitih ribljih proizvoda, uključujući i konzervirane, međutim u njihovoj studiji kontrolne analize su rađene tako što su ličinke naknadno dodane u procesuirani matriks. Također, koristili su i molekularne biljege manje veličine (< 200 bp) što, kao i u ovom istraživanju, povećava vjerojatnost amplifikacije čak i na fragmentiranoj DNA. Slično, Godínez-González i sur. (2017) nisu zabilježili probleme s amplifikacijom u procesuiranoj hrani zahvaljujući maloj veličini amplikona u SYBR Green qPCR sustavu detekcije DNA ličinki roda *Anisakis* kojeg su razvili. Rezultati upućuju na to da metode obrade ribljih proizvoda kao što je mariniranje, soljenje i termička obrada ne utječu na kvalitetu izolirane DNA iz ličinki oblića *A. pegreffii* te omogućavaju identifikaciju vrste ovog nametnika čak i većim molekularnim biljezima. Intenzivno procesuiranje i sterilizacija proizvoda snažno narušavaju integritet DNA i mogu utjecati na uspješnost primjene molekularnih metoda detekcije DNA oblića *A. pegreffii*. Detekcija DNA oblića roda *Anisakis* nije u direktnoj korelaciji s količinom alergena koji se mogu pronaći u ribi i ribljim proizvodima, iako su oboje u korelaciji s količinom samih ličinki, ali upućuje na prisutnost ličinki i može služiti kao osjetljivi popratni test za detekciju ovog nametnika u hrani (Lopez i Pardo, 2010; Fæste i sur. 2015).

U ovoj studiji istražen je direktan utjecaj metoda obrade ribljih proizvoda na ličinke nametnika, međutim istraživanja pokazuju da mikrouvjeti u samom ribljem matriksu tijekom

obrade mogu biti bitno drugačiji (pH, sadržaj vode, soli, prisustvo mikrobnih organizama) što može utjecati na integritet i permeabilnost kutikule ličinki, a time i na njihovu vijabilnost, pa tako i na stabilnost izolirane DNA što bi trebalo dodatno istražiti (Sánchez-Monsalvez i sur., 2005; Anastasio i sur., 2016).

4. ZAKLJUČCI

Simulacija tehnoloških procesa prerade ribljih proizvoda (termička obrada na 60°C i 80°C tijekom 15 minuta, mariniranje u 10% octenoj kiselini s 3% NaCl tijekom pet dana; soljenje u rasolu s 21% NaCl tijekom dva mjeseca) nije se pokazala dovoljno učinkovitom za narušavanje integriteta izolirane DNA iz ličinki oblića *Anisakis pegreffii*. Kod navedenih procesa moguće je korištenje standardnih molekularnih metoda determinacije vrste. Sterilizacija na 113°C bitno narušava kvalitetu izolirane DNA i prilikom analize DNA iz takvih proizvoda uputno je koristiti molekularne biljege manje veličine kako bi se olakšala PCR amplifikacija te različite kontrole u svrhu osiguravanja specifičnosti i osjetljivosti samih testova kako ne bi došlo do lažno pozitivnih ili negativnih nalaza.

5. LITERATURA

- Abollo E, Paggi L, Pascual S, D'Amelio S. 2003. Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s. s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infection, Genetics and Evolution*, 3: 175-181.
- Anastasio A, Smaldone G, Cacace D, Marrone R, Lo Voi A, Santoro M, Cringoli G, Pozio E. 2016. Inactivation of *Anisakis pegreffii* larvae in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) by salting and quality assessment of finished product. *Food Control*, 64: 115-119.
- Añíbarro B, Seoane FJ. 1998. Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102: 331-332.
- Armentia A, Martin-Gil FJ, Pascual C, Martin-Esteban M, Callejo A, Martinez C. 2006. *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16: 258-263.
- Audicana MT, del Pozo MD, Iglesias R, Ubeira FM. 2003. *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*. U: Miliotis MD, Bier JW (ur.), *International Handbook of Foodborne Pathogens*. CRC Press, Boca Raton, str. 613-636.
- Audicana MT, Kennedy MW. 2008. *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21: 360-379.
- Bao M, Pierce GJ, Pascua S, González-Muñoz M, Mattiucci S, Mladineo I, Cipriani P, Bušelić I, Strachan NJC. 2017. Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. *Scientific Reports*, 7: 43699.
- Blažeković K, Pleić IL, Đuras M, Gomerčić T, Mladineo I. 2015. Three *Anisakis* spp. isolated from toothed whales stranded along the eastern Adriatic Sea coast. *International Journal for Parasitology*, 45: 17-31.
- Caballero ML, Moneo I. 2004. Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitology Research*, 93: 248-251.
- Cavallero S, Martini A, Migliara G, De Vito C, Iavicoli S, D'Amelio S. 2018. *Anisakiasis* in Italy: Analysis of hospital discharge records in the years 2005–2015. *PLoS ONE*, 13: e0208772.
- D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanço M, Paggi L. 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology*, 30: 223-226.

- Dujardin F. 1845. *Historie naturelle des Helminthes*. Librairie encyclopedique de roret. Paris. 680 str.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2010. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8: 1543.
- Fæste CK, Plassen C, Løvberg KE, Moen A, Egaas E. 2015. Detection of proteins from the fish parasite *Anisakis simplex* in Norwegian farmed salmon and processed fish products. *Food Analytical Methods*, 6: 1390-1402.
- Froese R, Pauly D. Editors. 2019. Fishbase: Fishspecies in Mediterranean Sea. Dostupno sa: https://www.fishbase.de/trophiceco/FishEcoList.php?ve_code=13, pristupljeno: srpanj, 2019.
- Godínez-González C, Roca-Geronès X, Cancino-Faure B, Montoliu I, Fisa R. 2017. Quantitative SYBR Green qPCR technique for the detection of the nematode parasite *Anisakis* in commercial fish-derived food. *International Journal of Food Microbiology*, 261: 89-94.
- Gómez-Gutiérrez J, Robinson CJ, Kawaguchi S, Nicol S. 2010. Parasite diversity of *Nyctiphanes simplex* and *Nematoscelis difficilis* (Crustacea: Euphausiacea) along the northwestern coast of Mexico. *Diseases of Aquatic Organisms*, 88: 249-266.
- Gregori M, Roura Á, Abollo E, González ÁF, Pascual S. 2015. *Anisakis simplex* complex (Nematoda: Anisakidae) in zooplankton communities from temperate NE Atlantic waters. *Journal of Natural History*, 49: 755-773.
- Guardone L, Nucera D, Lodola LB, Tinacci L, Acutis PL, Guidi A, Armani A. 2018. *Anisakis* spp. larvae in different kinds of ready to eat products made of anchovies (*Engraulis encrasicolus*) sold in Italian supermarkets. *International Journal of Food Microbiology*, 25: 10-18.
- Hays R, Measures LN, Huot J. 1998. Euphausiids as intermediate hosts of *Anisakis simplex* in the St. Lawrence estuary. *Canadian Journal of Zoology*, 76: 1226–1235.
- Hochberg NS, Hamer DH. 2010. Anisakidosis: Perils of the Deep. *Clinical Infectious Diseases*, 51: 806-812.
- Lopez I, Pardo MA. 2010. Evaluation of a real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for detection of *Anisakis simplex* parasite as a food-borne allergen source in seafood products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 1469-1477.
- Mattiucci S, Cipriani P, Webb SC, Paoletti M, Marcer F, Bellisario B, Gibson DI, Nascetti G. 2014. Genetic and morphological approaches distinguishing the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi*

- n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). The Journal of Parasitology, 100: 199-214.
- Mattiucci S, Acerra V, Paoletti M, Cipriani P, Levsen A, Webb SC, Canestrelli D, Nascetti G. 2016. No more time to stay 'single' in the detection of *Anisakis pegreffii*, *A. simplex* (s.s.) and hybridization events between them: a multi-marker nuclear genotyping approach. Parasitology, 143: 998-1011.
- Mattiucci S, Cipriani P, Levsen A, Paoletti M, Nascetti G. 2018. Molecular epidemiology of *Anisakis* and anisakiasis: An Ecological and Evolutionary Road Map. Advances in Parasitology, 99: 93-263.
- Mattiucci S, Bello E, Paoletti M, Webb SC, Timi JT, Levsen A, Cipriani P, Nascetti G. 2019. Novel polymorphic microsatellite loci in *Anisakis pegreffii* and *A. simplex* (s.s.) (Nematoda: Anisakidae): implications for species recognition and population genetic analysis. Parasitology, 146: 1387-1403.
- Mladineo I, Poljak V, Martínez-Sernández V, Ubeira FM. 2014. Anti-anisakis IgE seroprevalence in the healthy Croatian coastal population and associated risk factors. PLOS Neglected Tropical Diseases, 8: e2673.
- Mladineo I, Popović M, Drmić-Hofman I, Poljak V. 2015. A case report of a *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. BMC Infectious Diseases, 16: 42.
- Mladineo I, Trumbić Ž, Radonić I, Vrbatović A, Hrabar J, Bušelić I. 2017. *Anisakis simplex* complex: ecological significance of recombinant genotypes in an allopatric area of the Adriatic Sea inferred by genome-derived simple sequence repeats. International Journal for Parasitology, 47: 215-223.
- Molina-Fernández D, Malagón D, Gómez-Mateos M, Benítez R, Martín-Sánchez J, Adroher FJ. 2015. Fishing area and fish size as risk factors of *Anisakis* infection in sardines (*Sardina pilchardus*) from Iberian waters, southwestern Europe. International Journal of Food Microbiology, 203: 27-34.
- Moneo I, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M. 2017. New perspectives on the diagnosis of allergy to *Anisakis* spp. Current Allergy and Asthma Reports, 17: 27.
- Mossali C, Palermo S, Capra E, Piccolo G, Botti S, Bandi C, D'Amelio S, Giuffra E. 2010. Sensitive detection and quantification of anisakid parasite residues in food products. Foodborne Pathogens and Disease, 7: 391-397.
- Pećina-Šlaus N, Nikuševa-Martić T, Perić J. 2009. Odabrane metode molekularne biologije, laboratorijski priručnik. Medicinska naklada, Zagreb, 92 str.

- Pravilnik o higijeni hrane životinjskog podrijetla. 2007. Narodne novine, br. 99/07; 28/10 i 45/11.
- Pravilnik o uvjetima i načinu stavljanja u promet riba i drugih morskih organizama. 2006. Narodne novine, br. 74/94; 57/96 i 48/05.
- Sánchez-Monsalvez I, de Armas-Serra C, Martínez J, Dorado M, Sánchez A, Rodríguez-Caabeiro F. 2005. A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* larvae. *Journal of Food Protection*, 68: 1066-1072.
- Smaldone G, Marrone R, Palma G, Sarnelli P, Anastasio A. 2017. Preliminary study on the inactivation of anisakid larvae in baccalà prepared according to traditional methods. *Italian Journal of Food Safety*, 6: 6964.
- Smith JW, Wootten R. 1978. *Anisakis* and anisakiasis. *Advances in Parasitology*, 16: 93-163.
- Solas MT, García ML, de las Heras C, Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Munoz M, Moneo I, Mendizábal A, Tejada M. *Anisakis simplex* antigens in fresh and frozen-thawed muscle of anchovies in vinegar. *Food Science and Technology International*, 15: 139-148.
- Thiel P. 1962. *Parasitology*. Cambridge University Press, 52 str.
- Tejada M, Olivares F, de la Heras C, Careche M, Solas MT, Garcia ML, Fernandez A, Mendizabal A, Navas A, Rodriguez-Mahillo AI, Gonzalez-Munoz M. 2014. Antigenicity of *Anisakis simplex* s.s. L3 in parasitized fish after heating conditions used in the canning processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95: 922-927.
- Turtinen LW, Juran BD. 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques*, 24: 238-239.
- Vidaček S, de la Heras C, Solas MT, Mendizabal A, Rodriguez-Marillo AI, Tejada M. 2010. Antigenicity and viability of *Anisakis* larvae infesting hake heated at different time-temperature conditions. *Journal of Food Protection*, 73: 62-68.