مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۴، ۱۴۰۰، ۳۹۷-۳۸۹
مقاله پژوهشی

بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی نماتود *سودوترونووا کربی* در ماهی هامور دریای عمان

محمد افضلی[۱]، رضا نبوی[۱]، فاطمه ناصری[۲]، محمد رهنما[۳]

[۱] *گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران*
[۲] *پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران*
[۳] *گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۸ مهر ماه ۱۴۰۰، **تاریخ پذیرش:** ۳۰ آذر ۱۴۰۰

10.22059/jvr.2021.305212.3075 20.1001.1.20082525.1400.76.4.2.6

چکیده

زمینهٔ مطالعه: با افزایش رشد جمعیت نیاز به مصرف ماهی بیش از گذشته شده است. بسیاری از انواع ماهی میزبان انگل‌های مشترک بین انسان و ماهی هستند. *آنیزاکیازیس* به عنوان یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و ماهی محسوب می‌شود. عامل این بیماری مرحله نوزادی نماتودهای خانواده آنیزاکیده از جمله "*سودوترونوا* و *آنیزاکیس*" هستند.

هدف: ماهی هامور که یکی از ماهیان خوراکی و با ارزش تجاری دریای عمان است، از نظر حضور نماتودهای خانواده آنیزاکیده مورد مطالعه قرار گرفت.

روش‌کار: تعداد ۲۶ نماتود از محوطه شکمی ماهی هامور از تعداد ۱۵ ماهی جدا سازی شد. به منظور بررسی ریخت شناسی، هر نمونه کرمی ابتدا با لاکتوفنل شفاف‌سازی شد. سپس با استفاده از میکروسکپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. پس از آن استخراج DNA انجام شد. با استفاده از پرایمرهای مربوط به قسمتی از ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک (Cox1) به اندازه bp ۷۱۰ وارد واکنش PCR شدند. در نهایت قطعه تکثیر شده مورد تعیین توالی قرار گرفت.

نتایج: نوزادها طولی در حدود ۱ تا ۳ سانتی‌متر، سفید رنگ و اغلب پیچ خورده بودند. در انتهای قدامی انگل تکمه و در برخی از نوزادها خار انتهایی دیده شد و در برخی از نوزادها شکمچه کوچک در انتهای مری قابل رؤیت بود. از ۲۶ نمونه نماتود به‌دست آمده، بعد از بررسی‌های ریختی ۸ نمونه *آنیزاکیس* تشخیص داده شد. این نمونه‌ها دارای خار انتهایی و سه لب قدامی بودند. بعد از تعیین توالی، نماتود *سودوترونووا* از نماتودهای خانواده آنیزاکیده شناسایی شد. درخت شجره‌ای کلاد جداگانه پارافایلیتیک را برای *سودوترونووای* جدا شده نشان داد.

نتیجه‌گیری نهایی: بررسی ریخت شناسی نوزادهای جدا شده را در خانواده آنیزاکیده قرار داد. نتایج مولکولی این نماتود را *سودوترونووا کربی* نشان داد. نتایج حاصل از تعیین توالی این انگل در بانک ژن با شماره MK317965 ثبت شد. این نماتود برای اولین بار از ماهی هامور دریای عمان جدا شده است.

کلمات کلیدی: ماهی هامور، آنیزاکیده، نماتود، *سودوترونووا کربی*، Cox1

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: رضا نبوی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
پست الکترونیکی: Reza.nabavi@basu.ac.ir

مقدمه

انگل‌های زئونوز (Zoonoses) در بسیاری از گونه‌های ماهی دیده می‌شوند. معمولاً آلودگی و عفونت ایجاد شده از این انگل‌ها در انسان، با مصرف ماهی به‌صورت خام یا نیم پخته ایجاد می‌شود، عادت‌های تغذیه‌ای و مصرف غذاهای دریایی که به‌صورت خام به مصرف می‌رسند، عمدتاً باعث انتقال انگل‌های خانواده آنیزاکیده می‌شود (۱۴).

ماهی هامور معمولاً در مناطق کم عمق ساحلی تا اعماق متوسط دریا زندگی می‌کند و بندرت تا عمق ۲۰۰ متری یافت می‌شود (۳). ماهی هامور بیشتر در مناطق سنگی و برجستگی کف دریا زندگی می‌کند، اما بعضی از گونه‌ها بسترهای ماسه‌ای و گلی پوشیده از علف‌های دریایی را جهت زیستن ترجیح می‌دهند (۲). نماتودهای مرتبط با آبزیان به ۱۷ خانواده تعلق دارند و از بین آن‌ها تنها ۵ خانواده اختصاص به ماهیان دارند.

غالباً حضور این انگل‌ها به شکل کیستی در داخل عضلات، کبد، سطح اندام‌های داخلی حفره بطنی، روده و گاهی در زیر پوست ماهی‌ها می‌باشند. همچنین ممکن است قلب، عروق خونی، چشم و غدد تناسلی نیز مورد آلودگی با انگل‌ها قرار گیرند. یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و ماهی آنیزاکیازیس (*Anisakiasis*) است. عامل انگلی این بیماری مرحله نوزادی نماتودهای *آسکارید* از جنس *آنیزاکیس* (*Anisakis*) می‌باشد (۱).

Pseudoterranova با نام‌های *پوروسکوم* (*Porrocaecum*) یا *ترونووا* (*Terranova*) شناخته می‌شود. بیماری ایجاد شده از این جنس همانند سایر جنس‌های خانواده آنیزاکیده، آنیزاکیازیس نام دارد. این نماتود قادر به آلوده کردن گونه‌های مختلف ماهی است. انسان از طریق خوردن این نماتود آلوده می‌شود. این بیماری از دسته بیماری‌های مشترک یا زئونوز است. گونه‌های *سودوترونووا* که اکنون به نام Sealworm شناخته می‌شوند قبلاً با نام Codworm شناسایی می‌شدند (۱۰).

در نماتودهای این جنس، مری در انتهای خلفی، شکمچه‌ای استوانه‌ای یا مستطیلی دارد. ممکن است ضمیمه‌ای از آن جدا شده و به طرف خلف کرم امتداد یابد. روده کور روده‌ای یا موجود است و یا وجود ندارد. کرم بالغ به طول ۲۰ میلی‌متر و عرض ۰/۴ میلی‌متر است و در انتهای قدامی یک دندان دارد. روده کور روده‌ای ندارد ولی شکمچه مری موجود و استوانه‌ای است (تصویر ۱). منفذ تناسلی نزدیک انتهای قدامی است (۵).

Pahlavan و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای به جداسازی و شناسایی نماتودهای جداشده از ماهی حسون دریای عمان در چابهار پرداختند (۱۰). آن‌ها *آنیزاکیس* جدا شده را با نام *آنیزاکیس پگرفی* در بانک ژن با شماره KF208687 ثبت کردند. گزارش آن‌ها اولین مطالعه مولکولی انگل *آنیزاکیس* در ماهی تجاری حسون دریای عمان بود و نشان داد که انگل‌های خانواده آنیزاکیده در دریای عمان نیاز به بررسی بیشتر و تشخیص گونه دارند.

Mattiucci و همکاران در سال ۲۰۲۰ به شناسایی مولکولی نوزاد *آنیزاکیس* ماهی‌های تجاری جنوب شرقی اقیانوس آرام در سواحل پرو پرداختند (۶). تعداد ۳۴۸ نمونه ماهی مورد بررسی قرار گرفت و از آغازگرهای میتوکندریایی cox2 جهت تعیین توالی استفاده شد. بعد از تحلیل‌های فیلوژنتیکی و تشخیص گونه مشخص شد که *Anisakis pegreffii* هم گوشت و هم احشاء را آلوده می‌کند، اما سایر گونه‌های *آنیزاکیس* فقط در احشاء ایجاد آلودگی می‌کنند. نتایج بدست آمده از این نوع مطالعات به بهبود دانش در مورد توزیع و پراکنش گونه‌های مختلف *آنیزاکیس* کمک می‌کند.

در مطالعه حاضر به بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی نماتود *سودوترونووا کربی* جدا شده از ماهی هامور دریای عمان پرداخته شده است. ماهی هامور یکی از ماهیان تجاری است که مصرف‌کنندگان بسیاری دارد و از این رو ارزیابی آن از لحاظ حضور انگل‌های مشترک بین انسان و ماهی دارای اهمیت است.

مواد و روش‌کار

تعداد ۱۵ قطعه ماهی هامور از نظر وزن در سه سایز کوچک (وزن تا ۵۰۰ گرم)، متوسط (وزن ۵۰۰ گرم تا ۱ کیلوگرم) و بزرگ (وزن بیش از ۱ کیلوگرم) دسته‌بندی شد. جهت بررسی‌های انگلی به آزمایشگاه منتقل شدند و اندام‌های مختلف بدن این ماهی‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، مورد ارزیابی انگل شناسی قرار گرفتند. سطح شکمی بدن ماهی از ناحیه مقعد تا قسمت سرپوش آبششی، برشی ذوزنقه‌ای داده شد و با چشم غیرمسلح مورد ارزیابی قرار گرفت، برای دقت بیشتر با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. برای ارزیابی حضور انگل در لوله گوارش برش‌هایی بالای معده و در قسمت انتهایی روده زده شد، مخاط معده و روده بررسی شد و انگل‌های متصل به مخاط جمع‌آوری و با میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۵).

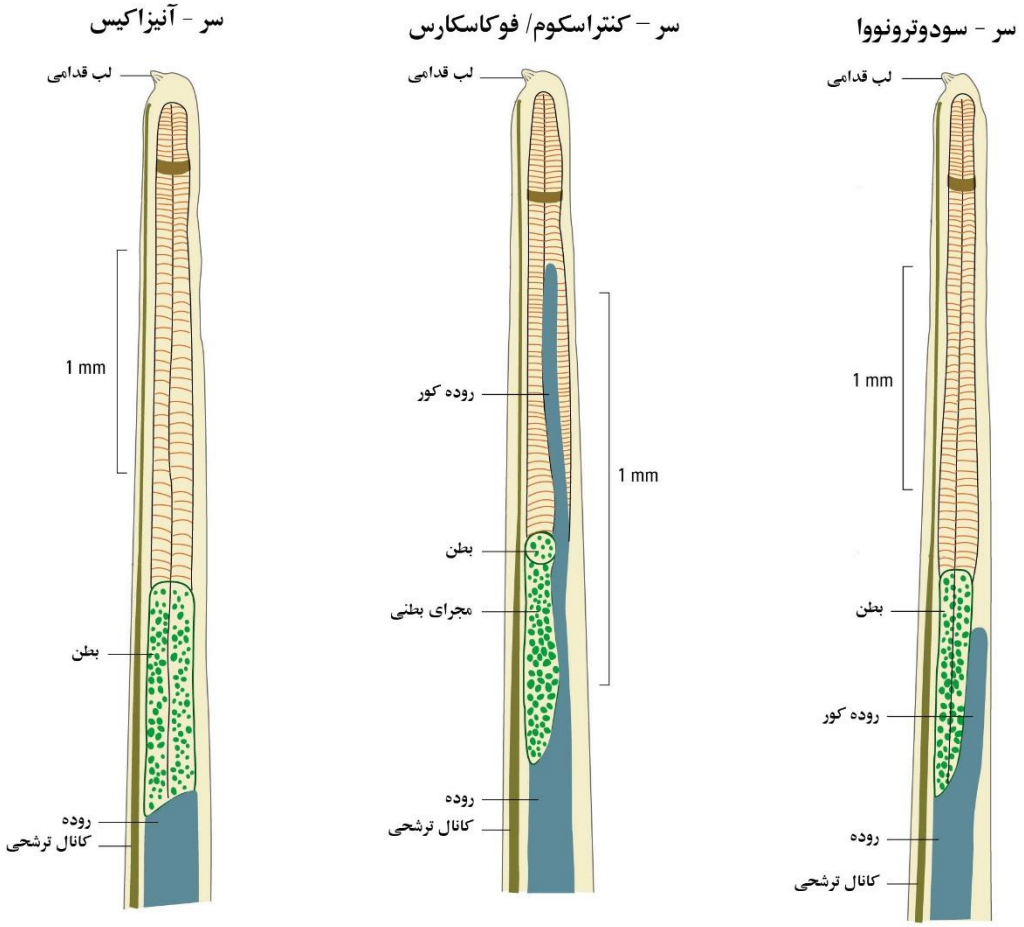
برای استخراج DNA، قسمت سر و انتهای نماتودهای یافت شده را جدا و در داخل لوله اپندورف حاوی الکل ۷۰ درجه، برای بررسی‌های ریخت‌شناسی قرار داده شد و قسمت میانی نماتود برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. استخراج DNA با استفاده از روش فنل – کلروفرم انجام شد (۱۱).

در مطالعه حاضر از یک جفت آغازگر (LCO1490F, HCO2198R) مربوط به ناحیه COXI از ژنوم میتوکندری استفاده شد (۱۷). مواد مورد استفاده در واکنش شامل بافر ۱۰X شرکت سیناکلون ۵ میکرولیتر، MgCl2 ۲۵ میلی مولار ۵ میکرولیتر، dNTP mix ۲/۵ میلی‌مولار ۵ میکرولیتر، آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو ۱۰ پیکومول هرکدام ۲/۵ میکرولیتر،

آنزیم تک‌پلیمراز ۲ یونیتی ۱ میکرولیتر و متناسب با غلظت DNA استخراجی، طوری که غلظت DNA در لوله‌ها ۳۰ نانوگرم باشد، به لوله‌ها DNA استخراجی افزوده شد. حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر بود. برنامه PCR برای دستگاه ترموسایکلر (Quanta Biotech, England) شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه انجام شد و طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR به دست آمده با ژل ۱ درصد آگارز وارد الکتروفورز گردید و در نهایت نمونه‌های مناسب جهت تعیین توالی به شرکت زیست فن‌آوری کوثر فرستاده شدند. نتایج به‌دست آمده از تعیین توالی محصولات با استفاده نرم‌افزار Mega 6 مورد آنالیزهای فیلوژنتیکی قرار گرفت.

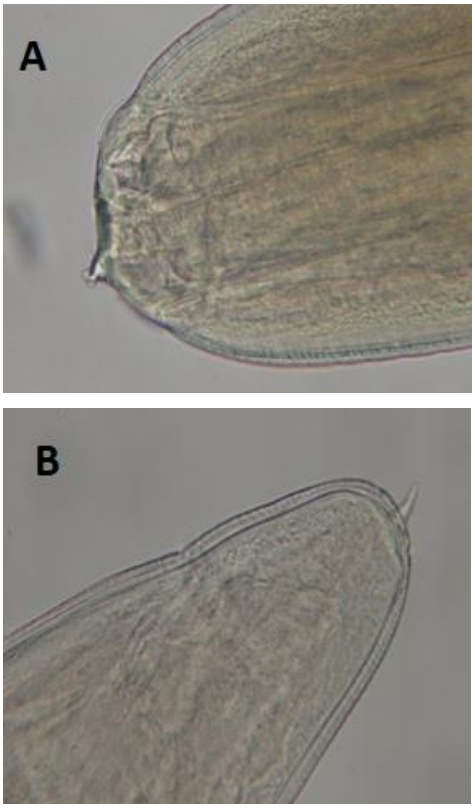
نتایج

نوزادهای جدا شده از دستگاه گوارش ماهی هامور در محدوده ۱ تا ۳ سانتی‌متر طول داشتند. این نوزادها سفید رنگ بوده و اغلب پیچ خورده بودند. در بررسی ریخت‌شناسی در تعدادی از نوزادهای جداشده در انتهای قدامی انگل تکمه‌ای به وضوح دیده می‌شد (تصویر ۲). در برخی از نوزادها خار انتهایی قابل مشاهده بود (تصویر ۲) و همچنین در برخی از نوزادها شکمچه کوچک در انتهای مری قابل رؤیت بود. موارد مشاهده شده فوق اثبات می‌کنند که تمام نوزادهای جدا شده از خانواده آنیزاکیده هستند و برای تشخیص جنس و گونه احتمالی حتماً باید از روش‌های مولکولی استفاده کرد.

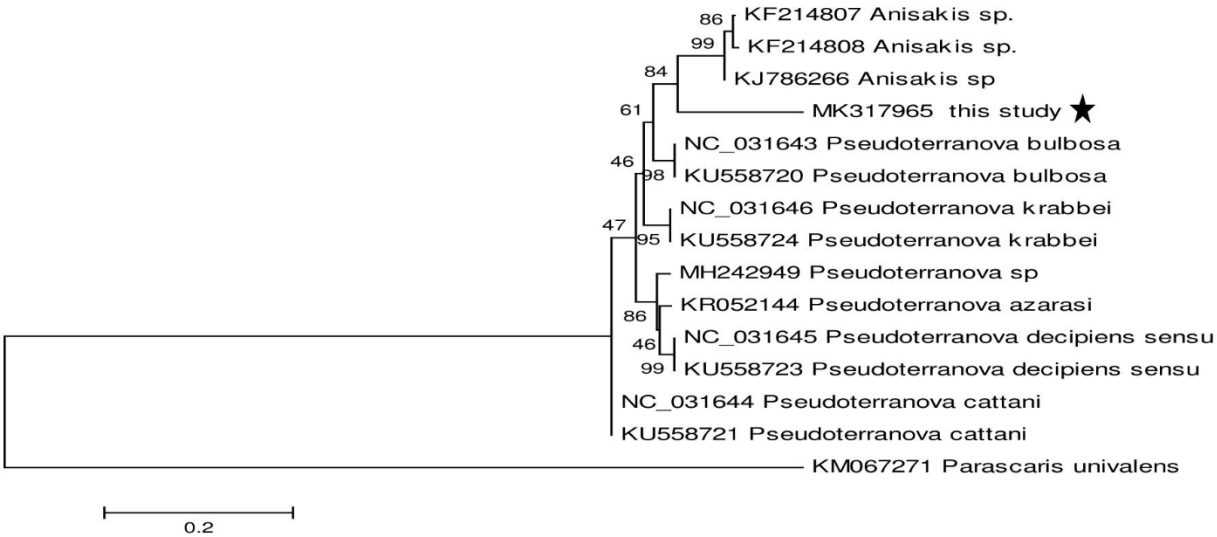


تصویر ۱. خصوصیات ریخت‌شناسی نوزادهای آنیزاکید جداشده از ماهی: *آنیزاکیس، کنتراسکوم/فوکاسکارس، سودوترونووا.*

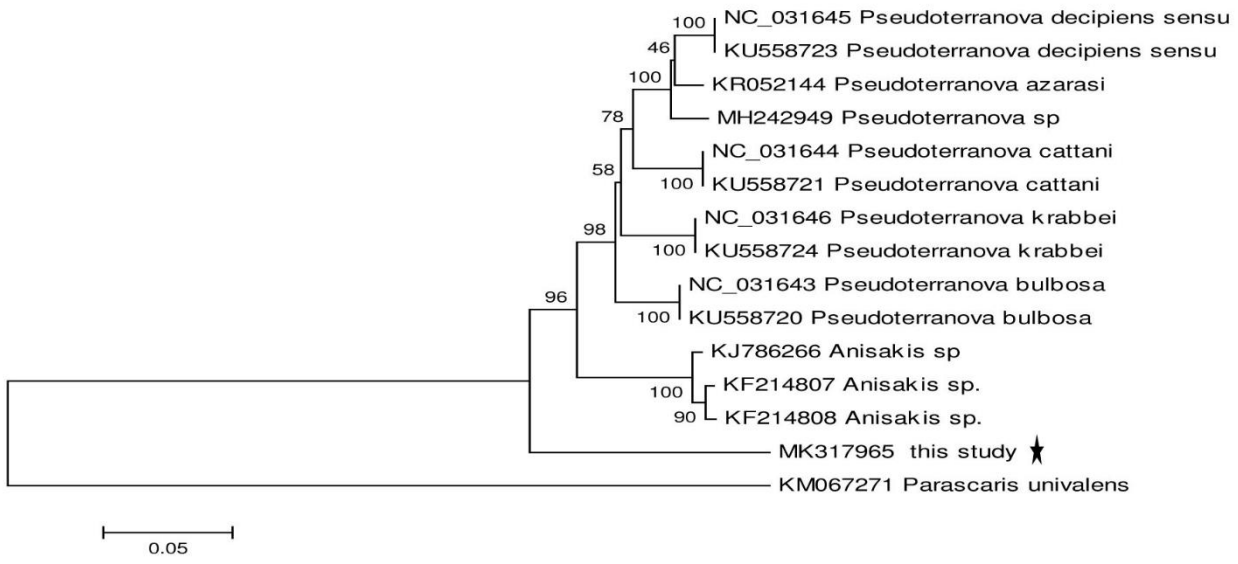
از ۲۶ نمونه نماتود به‌دست آمده، بعد از بررسی‌های ریختی ۸ نمونه *آنیزاکیس* تشخیص داده شد. این نمونه‌ها دارای خار انتهایی و سه لب قدامی بودند. از تمام ۲۶ نماتود استخراج DNA انجام شد و بعد از انجام واکنش PCR همگی در محدوده ۷۱۰ جفت بازی باند مثبت را نشان دادند. ۸ نمونه مثبت از نظر ریخت‌شناسی برای تعیین توالی به شرکت زیست فن آوری کوثر ارسال شد. از میان ۸ نمونه که مورد تعیین ترادف ژن قرارگرفت بعد از بررسی نتایج، همگی از جنس *Pseudoterranova* از خانواده آنیزاکیده تشخیص داده شدند. تطبیق ترادف‌های به‌دست آمده با ترادف‌های موجود در بانک جهانی ژن با برنامه Mega6 انجام شد. درخت شجره‌ای، با استفاده از دو روش Maximum Likelihood و Neighbor joining رسم شد، در این درخت‌ها از *Parascaris univalence* به‌عنوان خارج گروهی استفاده شد و نشان داد که گونه موجود در این بافت‌ها با اختلاف چند نوکلئوتید از گونه‌های *Pseudoterranova* متفاوت است و سپس توالی با شماره شناسایی MK317965 در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شد.



تصویر ۲. تصویر میکروسکپی نماتود در مطالعه حاضر: A دکمه در انتهای قدامی به وضوح قابل مشاهده است. B خار انتهایی به وضوح قابل مشاهده است.



تصویر ۳. درخت شجره‌ای برای سودوترونووا بر اساس توالی ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک با استفاده از آنالیز (ML) Maximum Likelihood با روش بوت‌استرپ، اعداد بوت استرپ با ۵۰۰ تکرار نشان داده شده است. گونه *Parascaris univalence* به عنوان خارج گروهی انتخاب شده است. گونه به‌دست آمده از این مطالعه با شماره MK317965 (*Pseudoterranova krabbei*) نشان داده شده است.



تصویر ۴. درخت شجره‌ای برای *سودوترونووا* بر اساس توالی ژن سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک با استفاده از تجزیه و تحلیل Neighbour Joining (NJ)، مدل P-distance، اعداد بوت‌استرپ با ۵۰۰ تکرار نشان داده شده است. گونه *Parascaris univalence* به عنوان خارج گروهی انتخاب شده است. گونه به‌دست آمده از این مطالعه با شماره MK317965 (*Pseudoterranova Krabbei*) نشان داده شده است.

درخت نشان داده شده در تصویر ۳ جدا بودن گونه به‌دست آمده با گونه‌های ثبت شده در بانک ژن، شامل گونه‌های جنس *آنیزاکیس* و جنس *سودوترونووا* را نشان می‌دهد. گونه به‌دست آمده با ۸۴ درصد بوت‌استرپ از گونه‌های جنس *آنیزاکیس* و با ۹۸ درصد بوت‌استرپ از گونه‌های جنس *سودوترونووا* حمایت می‌شود، که نشانه نزدیک بودن این‌گونه با گونه‌های *سودوترونووا* است. گونه *سودوترونووای* مطالعه حاضر با *سودوترونووا کربی* بیشترین قرابت و هم‌پوشانی را نشان داد. تحلیل درخت شجره شناسی به‌دست آمده نشان داد که گونه به‌دست آمده در این مطالعه رابطه خواهری با *سودوترونوواها* و *آنیزاکیس*‌های موجود در بانک ژن نشان نمی‌دهد که با ایجاد کلاد جداگانه پارافایلیتیک مسیر خود را جدا نموده است (تصویر ۴).

این نتایج ممکن است به دلیل کم بودن توالی‌های ثبت شده *سودوترونووا و آنیزاکیس* در بانک ژن باشد که نیاز به مطالعه وسیع‌تر در ماهیان مختلف دریای عمان و سایر مناطق ایران را دارد. با این حال با وجود فاصله ژنتیکی مشاهده شده در تصویر ۴ گونه به‌دست آمده با ۹۶ درصد بوت استرپ از گونه‌های *آنیزاکیس* و انواع *سودوترونووا* موجود در بانک ژن حمایت می‌شود که نشانه داشتن قرابت ژنتیکی اما نه به‌صورت خواهری است.

بحث

یکی از منابع مهم پروتئین در دنیا ماهی می‌باشد، ماهی در بالای زنجیره غذایی قرار دارد و بخش مهمی از رژیم غذایی انسان را به دلیل کیفیت بالای آن تشکیل می‌دهد. آلودگی‌های مختلف از جمله آلودگی‌های انگلی می‌تواند از عوامل تهدید کننده سلامت آبزیان باشد. با در نظر گرفتن این‌که منابع دریایی آبزیان محدود است و نیاز برای تکثیر و پرورش آبزیان وجود دارد، شناسایی و بررسی فراوانی انگل‌های آن‌ها و بررسی روش‌های کنترل بهداشتی می‌تواند از نظر اقتصادی در تولید آبزیان اثرگذار باشد (۱۳).

مصرف ماهی به‌صورت خام یا نیم‌پخته باعث ایجاد کانون‌های اپیدمی مرتبط با بیماری‌های انگلی در برخی از مناطق دنیا به‌خصوص جنوب شرقی آسیا که تمایل به مصرف ماهی به‌صورت خام دارند، شده است. تغییر ذائقه غذایی و میل به خوردن ماهی و آبزیان دریایی به‌صورت خام در دنیا رو به افزایش است و به دنبال آن شیوع بیماری‌های قابل انتقال از ماهی نیز زیاد شده است (۴).

با توجه به ارزش تجاری ماهیان دریای عمان، گزارش در مورد آلودگی‌های انگلی بسیار کم و یا در بعضی از ماهی‌ها وجود ندارد. در سال‌های اخیر مطالعات بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی در ایران و بسیاری از کشورها انجام شده است که در نتیجه آن انگل‌های بسیاری از قسمت‌های مختلف بدن ماهی جدا شده است. در مطالعاتی فراوانی انگل‌های کرمی ماهی شوریده، حلوای سیاه، سنگسر و سرخوی خلیج‌فارس، سستودهای *گریلوشیا* (Grillotia sp.)، *کاریوفیلوس* (Caryophyllaeus sp.) و *تترارینکوس* (*Tetrarhynchus* sp.) به‌صورت کیست

در اندام‌های مختلف دیده شده‌اند و ماهیان مورد مطالعه میزبان واسط برای سستودهای ذکر شده هستند (۱۵).

نوزادهای خانواده آنیزاکیده با هجوم به دستگاه گوارش انسان سندرومی به نام ائوزینوفیلیک گرانولوما را ایجاد می‌کند (۱۴). در سال‌های اخیر، آنیزاکیازیس به‌عنوان یکی از عوامل اصلی و مهم گاستروانتریت در نقاط مختلف دنیا شناخته شده است، در مطالعاتی که بر روی بیماران با دردهای شکمی و علائم آپاندیسیت مراجعه کننده به بیمارستان در کشورهای مختلف از جمله ایتالیا انجام شده است نماتود *آنیزاکیس پگرفی* از یک مرد و دو زن جدا و با استفاده از روش‌های مولکولی و تعیین توالی شناسایی و تأیید شده‌اند (۹). این مطالعات نشان دهنده اهمیت ردیابی و بررسی نماتودهای زئونوز در ماهیان تجاری مورد مصرف انسانی می‌باشد و همچنین اهمیت استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص سریع و کارآمد نماتودهای انگلی را نشان می‌دهد.

در ایران به دلیل استفاده ماهی به‌صورت پخته و عدم استفاده از آن به‌صورت خام تاکنون مواردی از انگل‌های نماتودی گزارش نشده است. البته باید مطالعات دقیق‌تر بر روی بیماران مراجعه کننده با علائم گاستروانتریت و آپاندیسیت انجام شود تا به‌طور مطمئن از نبود نماتود یقین حاصل شود (۱۲).

مطالعات مختلف درباره استفاده از آغازگرهای میتوکندریایی از جمله Mattiucci و همکاران در سال ۲۰۲۰ و Prosser و همکاران در سال ۲۰۱۳ آغازگرهای مناسب برای شناسایی انگل‌ها را نشان می‌دهد، که توالی قسمتی از ژن سیتوکروم اکسیداز یک و دو (Cox1 و Cox2) بارکدینگ و شناسایی مولکولی گونه‌های انگلی مختلف از جمله خانواده آنیزاکیده مفید می‌باشد و می‌تواند اختلافات ژنتیکی را به نمایش بگذارد. آغازگرهای سیتوکروم اکسیداز زیر واحد یک بودند که نتایج مطالعه آن‌ها با نتایج مطالعه حاضر مطابقت نشان می‌دهد.

Timi و همکاران در سال ۲۰۱۴ شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی نوزادهای *سودوترونووای* جداشده از نمونه‌های ماهی را در آب‌های آرژانتین انجام دادند (۱۶). نوزادها با آغازگرهای سیتوکروم C اکسیداز، زیرواحد II (mtDNA cox2)، ITS-1 و ITS-2 تکثیر شدند و سپس تعیین توالی شدند و با تمام گونه‌های *P. decipiens (sensu lato)* ثبت شده در بانک ژن مقایسه شدند. نتایج نشان داد که گونه مورد مطالعه با گونه‌های جداشده و ثبت شده از شیر دریایی جنوبی (*Otaria flavescens*) از آرژانتین و سواحل شیلی دارای مشابهت ژنتیکی است. تعیین توالی برای Cox2 ۱۰۰ درصد مشابهت ژنی را با توالی‌های ثبت شده در دسترس در بانک ژن برای گونه *Pseudoterranova cattani* نشان دادند.

در مقایسه نتایج به دست‌آمده از مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام شده نشان داد که استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی برای شناسایی جنس انگل وگاهی برای تشخیص گونه انگل مفید است اما با استفاده از روش‌های مولکولی با استفاده از توالی‌های مختلف میتوکندریایی از جمله Cox1، Cox2 همچنین توالی‌های DNA ریبوزومی می‌توان روابط ژنتیکی این گونه‌ها و شناسایی دقیق آن‌ها را به دست آورد. همچنین می‌توان میزبان‌های واسط و نهایی را در مناطق مختلف جغرافیایی و در نتیجه چرخه زندگی انگل در هر ناحیه جغرافیایی را تعیین و با نقاط مختلف دنیا مقایسه نمود.

در طی مطالعه حاضر از ماهی‌های هامور که از نظر وزن در سه سایز کوچک (وزن تا ۵۰۰ گرم)، متوسط (وزن ۵۰۰ گرم تا ۱ کیلوگرم) و بزرگ (وزن بیش از ۱ کیلوگرم) دسته‌بندی شده بودند، استفاده شد که در ماهی‌های با سایز کوچک و متوسط انگل جداسازی نشد و تنها در ماهی‌های با سایز بزرگ این نماتود جداسازی گردید. در ماهی‌های سایز بزرگ علاوه بر نماتودهای انگلی مشاهده شده در دستگاه گوارش، در بافت ماهی انگل‌های دیگری نیز مشاهده شد، از جمله کیست‌های مربوط به انگل‌های سستودی که در دیواره شکمی ماهی هامور مشاهده شد. همچنین انگل *فیلومترا* در یکی از نمونه‌ها قابل مشاهده بود. به‌طور کلی هر چه سایز و وزن ماهی بیشتر بود به تعداد انگل‌های موجود در ماهی افزوده می‌شد که این نتیجه با نتیجه Rasoli در سال ۲۰۱۴ که بر روی جداسازی نماتودهای خانواده آنیزاکیده در شانک ماهیان زردباله (*Acanthopagrus latus*) وحشی و پرورشی در خلیج‌فارس کار نمودند مطابقت دارد. آن‌ها در مطالعه خودشان ارتباطی معنی‌دار و مثبت بین وزن ماهی و بار انگلی مشاهده‌کردند و نتیجه گرفتند که با افزایش وزن بر بار انگلی مربوط به *آنیزاکیس* افزوده می‌شود. همچنین در مطالعه Ebrahimzadeh Mosavi و همکاران در سال ۲۰۱۴ میزان فراوانی آلودگی به نماتود *آنیزاکیس* ۵ درصد بود (۴). آن‌ها اختلاف بین میانگین وزن در ماهی سالم و ماهی آلوده را معنی‌دار اعلام نمودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. تطبیق ترادف‌های به‌دست آمده با ترادف‌های

موجود در بانک جهانی ژن با برنامه Mega 6 انجام شد و نشان داد که گونه موجود در این بافت‌ها با اختلاف چند نوکلئوتید از گونه‌های *سودوترونووا کربی* ثبت شده در بانک ژن متفاوت است.

مطالعه Peyghan و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی ماهی هامور، انگل‌های مختلفی از جمله نماتود، ترماتود، سستود و آکانتوسفال در اندام‌های مختلف این ماهی جداسازی نمود؛ که از جمله خانواده آنیزاکیده از بیش‌ترین نماتودهای جدا شده از ماهی هامور بودند (۱۳). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناسی بود. آن‌ها دریافتند که گونه‌های *آنیزاکیس* یکی از انگل‌های رایج در ماهی هامور است. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد همان‌طور که انگل‌های دیگری بجز خانواده آنیزاکیده در ماهی هامور دریای عمان مشاهده شد. در مطالعه حاضر علاوه بر استفاده از بررسی‌های ریخت‌شناسی از روش‌های مولکولی هم استفاده شد که نتایج دقیق‌تر و مطمئن‌تر از گونه به‌دست آمده حاصل می‌گردد. با توجه به درخت‌های شجره‌ای حاصل از تطبیق ترادف انگل به‌دست آمده نشان می‌دهد که نیاز به بررسی دقیق‌تر و کامل‌تر انگل‌های به‌دست آمده در ماهی هامور دریای عمان و مقایسه آن با سایر انگل‌های به‌دست آمده از سایر ماهی‌های دریای عمان و سایر نقاط ایران و جهان است؛ زیرا با توجه به کم بودن توالی‌های موجود در بانک ژن آنالیز دقیق‌تر این انگل نیاز به مطالعات اپیدمیولوژیک را نشان می‌دهد تا میزبان‌های واسط و نهایی این انگل در دریای عمان مشخص گردد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که این انگل برای اولین بار در ایران از ماهی هامور دریای عمان جداسازی شده است. همچنین تفاوت بسیار مابین نماتودهای جدا شده از ماهی هامور سایر نقاط ایران با نماتودهای خانواده آنیزاکیده مورد بررسی در این مطالعه وجود دارد. همچنین با بررسی درخت شجره‌ای تفاوت مابین نماتودهای خانواده آنیزاکیده جدا شده از نقاط مختلف دنیا با نماتودهای خانواده آنیزاکیده مورد بررسی در مطالعه حاضر وجود دارد. روابط شجره‌ای میان انگل گوارشی جدا شده از ماهی هامور دریای عمان در مقایسه با دیگر گونه‌های مناطق دیگر دنیا از قرابت ژنتیکی فاصله دوری را نشان می‌دهد که می‌توان نتیجه گرفت که انگل *سودوترونووا کربی* جدا شده از ماهی هامور در مطالعه حاضر می‌تواند بومی ایران باشد که با مطالعه حضور این انگل در پستانداران دریایی موجود دریای عمان می‌توان مقایسه‌ای بین شباهت ژنی نماتود جدا شده با نماتودهای موجود در این پستانداران انجام داد و در نهایت چرخه زندگی این نماتود را تعیین نمود. با توجه به این‌که مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران انجام شده است نیاز به مطالعات دقیق‌تر بر روی سایر ماهیان اهمیت خود را نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته انگل‌شناسی می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت اداره کل و اداره محترم دامپزشکی چابهار برای همراهی در انجام این پژوهش اعلام قدردانی نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Ángeles-Hernández, J.C., Gómez-de Anda, F.R., Reyes-Rodríguez, N.E., Vega-Sánchez, V., García-Reyna, P.B., Campos-Montiel, R., Zepeda-Velázquez, A.P. (2020). Genera and species of the anisakidae family and their geographical distribution. Animals, 10(12), 2374. https://doi.org/10.3390/ani10122374
2. Clarke, K.R., Gorley, R.N., Somerfield, P.J., Warwick, R.M. (2014). Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation. (3rd ed.) Primer-E Ltd. Devon, UK.
3. Dadzie, S. (2007). Vitellogenesis, oocyte maturation pattern, spawning rhythm and spawning frequency in *Otolithes ruber* (Schneider, 1801)(Sciaenidae) in the Kuwaiti waters of the Arabian Gulf. Sci Mar, 71(2), 239-248.
4. Ebrahimzadeh Mousavi, H., Soltani, M., Paulin, S., Mobadi, I., Abdi, K., Taheri MirGhaed, A., Barzegar, S. (2014). Study of worm parasites in several species of Persian Gulf fish. Iran J Vet Res, 10(4), 5-12. (In Persian).
5. Eslami, A. (2006) Veterinary Helminthology, Nematode and Achantocephala. (2nd ed.) Tehran University Pess. Tehran, Iran.
6. Mattiucci, S., Alburqueque, R. A., Santoro, M., Palomba, M. (2020). Molecular identification of zoonotic parasites of the genus anisakis (Nematoda: Anisakidae) from fish of the southeastern pacific ocean (off peru coast). Pathogens, 9(11), 910. https://doi.org/10.3390/pathogens9110910
7. Mattiucci, S., Paoletti, M., Borrini, F., Palumbo, M., Palmieri, R.M., Gomes, V., Nascetti, G. (2011). First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. BMC Infect, 11(1), 82. https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-82 PMID: 21453522
8. Measures, LN. (2014). Anisakiosis and Pseudoterranovosis. (1st ed.) National Wildlife Health Center. Virginia, USA. https://doi.org/10.3133/cir1393

9. Naseri, F. (2014). Theoretical and Practical Guide to DNA Extraction. (1st ed.) Nosouh Publications. Esfahan, Iran. (In Persian).
10. Pahlavan, A., Goodarzi, R., Nayebzade, H. (2013). Phylogeny study of nematode *Anisakis* in fish commercial, *Saurida tumbil* based on mitochondrial CO1 gene sequence. Zhinitik Hizarahi Sivvum, 43(4). (In Persian).
11. Pazuki, J., Khosh Iqbal, M., Masoumian, M. (2013). Study of *Otolithes ruber* in the Persian Gulf to infected parasites. J Vet Res, 68(1), 53-60. (In Persian).
12. Peyghan, R. (2003). Fish parasites and Parasitic Diseases. (1st ed.) Noorbakhsh Publications. Tehran, Iran. (In Persian).
13. Peyghan, R., Haghouqi Rad, N., Mesbah, M., Rastkardad, M. (2006). Study of the abundance of worm parasites in *Otolithes rubber*, Pestadasus niger, Pomadasys kaakan and Lutjanus malabaricus in the Persian Gulf. Iran J Vet Res, 10(12). (In Persian).
14. Prosser, S.W., Velarde-Aguilar, M.G., León-Règagnon, V., Hebert, P.D. (2013). Advancing nematode barcoding: a primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. Mol Ecol Resour, 13(6), 1108-1115. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12082 PMID: 28765811
15. Rasouli, S. (2014). Study of parasitic nematodes of Anisakdae family in wild and farmed *Acanthopagrus latus* northern shores of the Persian Gulf, Iran. Comparative Pathobiology, Scientific Res, 11(4), 1437-1446. (In Persian).
16. Timi, J.T., Paoletti, M., Cimmaruta, R., Lanfranchi, A.L., Alarcos, A.J., Garbin, L., Mattiucci, S. (2014). Molecular identification, morphological characterization and new insights into the ecology of larval *Pseudoterranova cattani* in fishes from the Argentine coast with its differentiation from the Antarctic species, *P. decipiens sp*. E (Nematoda: Anisakidae). Vet Parasitol, 199(1-2), 59-72 https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.09.033
17. Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotechnol, 3(5), 294-9.

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 76, Number 4, 2022
Original Article

Morphological and Molecular Study of *Pseudoterranova krabbei* Nematoda in Oman Sea Epinephelus Fish

Mohammad Afzali[1], Reza Nabavi[1], Fatemeh Naseri[2], Mohammad Rahnama[3]

[1] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran*
[2] *Biotechnology Research Institute, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran*
[3] *Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran*

10.22059/jvr.2021.305212.3075

Received: *20 October 2021,* ***Accepted:*** *21 December 2021*

Abstract

BACKGROUND: As the population grows, there is further need to food, and fish is not an exception. Several fish species are potential sources of common parasites between humans and fish. One of the important diseases common between human and fish is Anisakiasis. The parasitic agent of this disease is the larval stage of the Anisakid family nematodes, including *Pseudoterranova* and *Anisakis*.

OBJECTIVES: In this study, Epinephelus fish, one of the edible and commercial valuable fishes of the Oman Sea, was examined for the presence of nematodes of the Anizakidae family.

METHODS: Fifteen out of the 26 specimens were infected with Nematodes. Nematodes were isolated from fish abdominal area. For morphological study, each nematode sample was first clarified with lactophenol. Subsequently, it was examined using an optical microscope. After morphological examination of these nematodes, DNA extraction was performed. Using primers related to a part of cytochrome oxidase subunit 1 (Cox1), PCR products were 710 bp for PCR reaction. Finally, the amplified fragment was sequenced.

RESULTS: The larvae were about 1 to 3 cm long, white, and often twisted. At the anterior end of the parasite, a button was seen, and in some larvae, a terminal spine was observed. In certain larvae, a small abdomen at the end of the esophagus can be seen. Out of the obtained 26 nematode specimens, eight *Anisakis* specimens were identified following morphological analysis. These specimens had terminal spines and three anterior lips. After sequencing, *Pseudoterranova* nematode was identified to belong to aniakidae family. Separate clad tree showed paraphylitic for isolated *Pseudoterranova*.

CONCLUSIONS: Morphological examination categorized isolated larvae as the Anizakidae family. Other molecular results of this nematode showed *Pseudoterranova krabbei*. The results of sequencing this parasite were recorded in the gene bank under the Accession number: MK317965. This nematode was initially isolated from the Oman Sea Epinephelus fish.

Keywords: Epinephelus fish, Anizakidae, Nematode, *Pseudotronova krabbei*, Cox1

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: Reza.nabavi@basu.ac.ir Tel/Fax: 024-33052660/081-38381601

How to cite this article:

Afzali, M., Nabavi, R., Naseri, F., Rahnama, M. (2022). Morphological and Molecular Study of *Pseudoterranova krabbei* Nematoda in Oman Sea Epinephelus Fish. J Vet Res, 76(4), 389-397. https://doi.org/10.22059/jvr.2021.305212.3075

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Morphological characteristics of Anisakis larvae isolated from fish: *Anisakis*, *Contracaecum*/ *Phocascaris*, *Pseudoterranova* (Measures 2014).

Figure 2. Microscopic image of the nematode (This study): A is clearly visible at the anterior end of the button; B) The end thorn is clearly visible.

Figure 3. Phylogeny tree for *Pseudoterranova* based on the gene sequence of the cytochrome oxidase subunit one using the Maximum Likelihood (ML) analysis with the Bootstrap test, the boot strap numbers with 500 replications are shown. The *parascaris* univalence species was selected as the out group. The species obtained from this study is shown under the number MK317965 (*Pseudoterranova krabbei*).

Figure 4. Phylogeny tree for *Pseudoterranova* based on the gene sequence of the cytochrome oxidase subunit one using the Neighbor Joining (NJ) analysis , P-distance Model, the Bootstrap numbers are shown 500 replications. The *Paraascaris univalence* species was selected as the out group. The type obtained from this study is shown under the number MK317965 (*Pseudoterranova krabbei*).