1029-AMIWR2019

# بررسی انگل‌های زئونوزکنتراسکوم رودولفی و آنیزاکیس پگرفی (نماتدآ: آنیزاکیده) جدا شده از ماهی بنی(*Mesopotamichthys sharpeyi*) و شیربت (*Brbus grypus*) تالاب شادگان به روش مولکولی

فروغ محمدی[1*] - عباس جلودار[2] - مهرزاد مصباح[3] - محمدحسین راضی جلالی[4]

۱. بخش آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲. گروه علوم پایه ، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

۳. گروه علوم درمانگاهی ، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

۴. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

## مقدمه

ماهیان بنی و شیربت از ماهیان با ارزش اقتصادی و از خانواده کپورماهیان هستند. انگل‌های خانواده آنیزاکیده (آنیزاکیس و کنتراسکوم) شامل بعضی گونه‌های زئونوز نیز می‌باشد که گسترش جهانی دارند. اغلب بیماری‌های منتقله از طریق تغذیه با جانوران آبی به نماتدهای جنس آنیزاکیس و کنتراسکوم برمی‌گردد. به بیماری‌هایی که عامل آن‌ها لاروهای اعضای خانواده آنیزاکیده هستند، آنیزاکیازیس می‌گویند. با توجه به گسترش تمایل مردم به خوردن غذاهای خام یا نیمپز تعداد موارد آنیزاکیازیس رو به آفزایش گذاشته است. آنیزاکیدها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی قابل تفریق هستند اما بهترین روش تعیین گونه نماتدها تشخیص مولکولی است. به تازگی استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در ناحیه (ITS) به طور گسترده‌ای در تشخیص گونه‌های آنیزاکیس استفاده شده است(Zhu و همکاران، ۱۹۹۸.، Pontes و همکاران، ۲۰۰۵.، D'Amelio و همکاران، ۲۰۰۰). هدف از این مطالعه تعیین گونه‌های انگل‌های جنس‌های آنیزاکیس و کنتراسکوم جدا شده ماهی بنی و شیربت تالاب شادگان استان خوزستان که بزرگترین تالاب ایران است، با استفاده از روش مولکولی می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** کنتراسکوم رودولفی-آنیزاکیس پگرفی-شیربت-بنی-تشخیص مولکولی

## مواد و روش‌ها

در این پژوهش تعداد ۱۰۰ عدد ماهی بنی و ۱۰۰ عدد ماهی شیربت صید شده از تالاب شادگان در چند مرحله (مهر ۹۵ تا اردیبهشت ۹۶ ) و بدون در نظر گرفتن فصل خاص، از صیادان محلی خریداری گردید و به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شد. در این مطالعه استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ، SinaPure DNA KIT، Cat. No. PR881613/EX6011 (شرکت سیناکلون، تهران)، انجام شد. بعد از استخراج ژنوم DNA از نمونه‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از پرایمر NC5-NC2 و به منظور توسعه کل قطعه ITS انجام شد. به منظور تعیین توالی ژن مورد نظر، ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی رفت و برگشت، بصورت جداگانه برای شرکت تکاپوزیست در تهران ارسال و در آنجا تخلیص و توالی‌یابی گردید. در پایان نیز ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم-افزار MEGA7 انجام گردید.

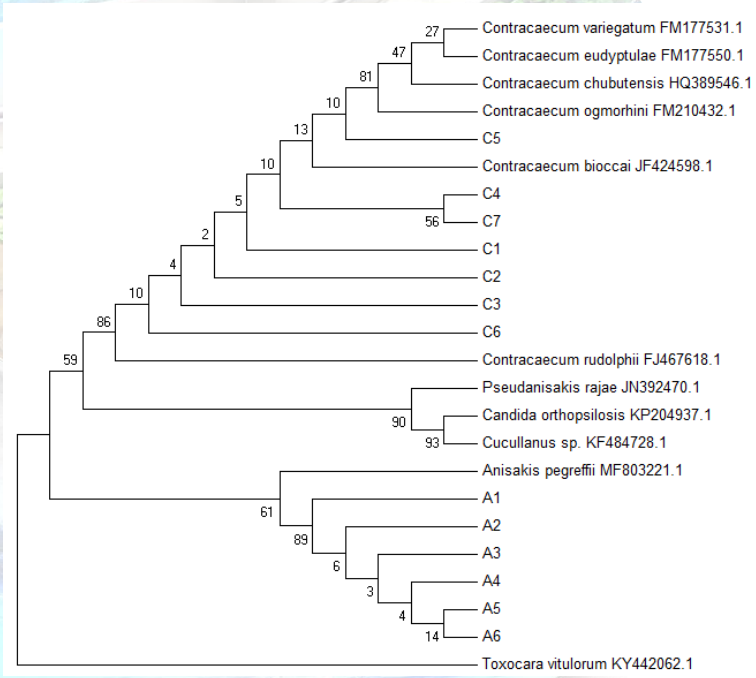
## نتایج و بحث

پس از بررسی روده ماهیان مورد مطالعه نماتدهای جنس‌های آنیزاکیس و کنتراسکوم از روده ماهیان بنی و شیربت صید شده از تالاب شادگان که از تالاب‌های مهم بین المللی با غنای گونه‌ای بالا در ایران است، جداسازی شدند. بر اساس توالی یابی دوجهته

صورت گرفته همچنین ترسیم درخت فیلوژنی(شکل شماره ۱) و بررسی فاصله ژنتیکی، همه نماتدها متعلق به دو گونه آنیزاکیس پگرفی(*Anisakis pegreffii*) و کنتراسکوم رودولفی(*Contracaecum rudolphii*) بودند. در این بررسی برای نخستین بار گسترش آنیزاکیس پگرفی و کنتراسکوم رودلفی در ماهیان بنی و شیربت تالاب شادگان گزارش می‌شود. در ایران اطلاعات کمی در ارتباط با انگل‌های مهم اجتماعی و اقتصادی وجود دارد (Shamsi و Aghazade، ۲۰۱۱ ). اولین مطالعه در ارتباط با خصوصیات ژنتیکی نماتد خانواده آنیزاکیده در ایران توسط شمسی و آقازاده (۲۰۱۱) انجام شد، تا قبل از آن مطالعه‌ای بر روی خصوصیات ژنتیکی نماتدها در ایران انجام نشده بود (Shamsi و همکاران، ۲۰۰۹؛ Paggi و Bullini، ۱۹۹۴). مطالعه‌ای که شمسی و آقازاده در سال ۲۰۱۱ انجام دادند بررسی مورفولوژیکی و مولکولی نماتد کنتراسکوم بوده است که در این تحقیق گونه کنتراسکوم را*C.multipapillatum* تشخیص دادند، مطالعات قبل از آن نشان می‌دهد که این روش برای تشخیص نماتد کنتراسکوم بسیار کاربردی و مناسب است (Shamsi و همکاران، ۲۰۱۱).

پهلوان و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی فیلوژنی آنیزاکیس‌های جداشده از ماهی حسون در دریای عمان آلودگی به *آنیزاکیس پگرفی* را گزارش کردند. در آن مطالعه که برای اولین بار آلودگی ماهی حسون به *آنیزاکیس پگرفی* گزارش شده‌است، تشخیص مولکولی

گونه آنیزاکیس با استفاده از توالی بخشی از ژن میتوکندریایی CO1 سیتوکروم اکسیداز و به روش PCR انجام شد، در حالیکه در مطالعه حاضر از توالی ژن NC5-NC2 استفاده گردید.




**شکل ۱: درخت فیلوژنیک نماتدهای جدا شده بر اساس توالی ژن NC5-NC2 و توالی‌های مشابه از دیگر ارگانیسم‌ها با استفاده از آنالیز NJ. اعداد bootstrap بر اساس 1000 replication است (اعداد کنار شاخه‌ها درصد تکرار در آزمون bootstrap و اعداد روبروی گونه‌ها شماره ثبت ژن‌های مورد نظر در بانک ژن است)**

## منابع

پهلوان، ع.، گودرزی، ر. و نایب زاده، ح. ۱۳۹۲. بررسی فیلو ژنی نماتد آنیزاکیس در ماهی تجاری حسون دریای عمان بر اساس توالی میتوکندریایی CO1. فصلنامه ژنتیک در هزاره سوم، سال یازدهم، شماره ۴، ۳۳۰۵-۳۲۹۷.

D'Amelio S, Mathiopoulus KD, Santos C, Pugachev ON, Webb SC, Picanc, o M, Paggi L 2000. Genetic markers in ribosomal DNA fo the identification of members of the genus Anisakis (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International journal of parasitology*, 30, 223–226.

Paggi, L. and Bullini, L. 1994. Molecular taxonomy in anisakids. *Bulletin of the Scandinavian Society of Parasitology*, 4, 25-39.

Pontes T, D'Amelio S, Costa G, Paggi L 2005. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *Journal of Parasitology*, 91,1430–1434.

Shamsi, S.; Aghazadeh-Meshgi, M. 2011. Morphological and genetic characterisation of selected *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) larvae in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(2), 356-361.

Shamsi, S.; Gasser, R. B. and Beveridge, I. 2011. Mutation scanning-coupled sequencing of nuclear ribosomal DNA spacers as a tool for the specific identification of different contracaecum (nematoda: Anisakidae) larval types. *Molecular and Cellular Probes*, 25(1), 13-18.

Shamsi, S.; Norman, R.; Gasser, R. and Beveridge, I. 2009. Redescription and genetic characterization of selected *contracaecum* spp. (nematoda: Anisakidae) from various hosts in australia. *Parasitology Research*, 104(6), 1507-1525.

Zhu, X., Gasser, R.B., Podolska, M., Chilton, N.B., 1998. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International journal of parasitology*, 28, 1911–1921.