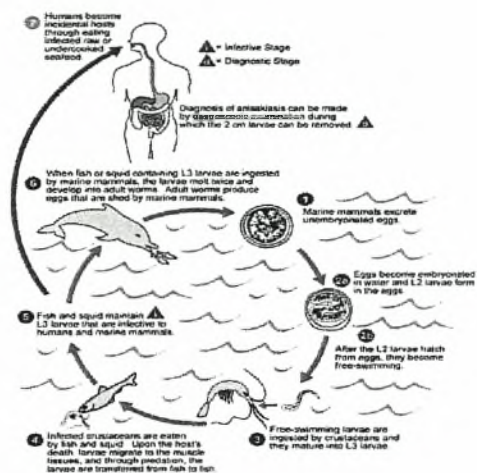




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## Μοριακή ταυτοποίηση ειδών του γένους *Anisakis*, σε θαλάσσια θηλαστικά του κόλπου του Μεξικού



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΑΝΝΙΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Εποπτεύοντες καθηγητές: D'Amelio Stefano  
Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

2004



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4301/1

Ημερ. Εισ.: 24-02-2005

Δωρεά:

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΓΙΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087996

**Μοριακή ταυτοποίηση ειδών του γένους *Anisakis*, σε θαλάσσια θηλαστικά του  
κόλπου του Μεξικού**

Του

**Γιαννιού Παναγιώτη**

Πτυχιακή εργασία που υποβάλλεται προς μερική  
εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση  
του πτυχίου

Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2004

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο του  
Dr. Stefano D' Amelio στο Πανεπιστήμιο της Ρώμης 'La Sapienza'

Università Degli Studi di Roma 'La Sapienza'  
1 Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Istituto delle Scienze di Sanita Pubblica 'Giorgio Sanarelli'  
Dipartimento di Parassitologia

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## 1. Εισαγωγή

### 1.1. Νηματώδεις

1.1.1. Γένος *Anisakis*

1.1.2. Γένος *Pseudoterranova*

### 1.2. Η χρησιμοποίηση μοριακών εργαλείων για την ταυτοποίηση των νηματωδών

1.2.1. Ανάλυση περιοχών ριβοσωμικού DNA (Ribosomal DNA spacers)

1.2.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

1.2.3. PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism

### 1.3. Σκοπός της εργασίας

## 2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά παρασίτων, μορφολογική παρατήρηση δειγμάτων

2.2. Απομόνωση γενωμικού DNA και ενζυμική ενίσχυση περιοχών rDNA

2.5. PCR-RFLP

2.6. Καθαρισμός προϊόντων PCR, αλληλούχιση περιοχών rDNA

## 3. Αποτελέσματα

3.1. Μικροσκοπική παρατήρηση των προς ανάλυση δειγμάτων

3.2. Ενίσχυση με PCR

3.3. PCR-RFLP ανάλυση

3.4. Ανάλυση αλληλουχιών

3.5. Γενετικές αποστάσεις ανάμεσα σε άτομα του γένους *Anisakis* και τα είδη προς ανάλυση

## 4. Συζήτηση

## 5. Αναφορές-Βιβλιογραφία

## 6. Παράρτημα

# 1-ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Νηματώδεις

Μεταξύ των μελών του ζωικού βασιλείου οι νηματώδεις αποτελούν μια αρκετά επιτυχημένη ομάδα ειδών και παρά το ότι έχουν ταυτοποιηθεί 15.000 άτομα κατά προσέγγιση, εκτιμάται πως ο αριθμός αυτός αποτελεί μέρος μόνο του συνόλου. Θεωρώντας πως κάτι τέτοιο πραγματικά ισχύει, οι νηματώδεις τοποθετούνται δεύτεροι πίσω από τα αρθρόποδα σε αριθμό ειδών και ατόμων.

Οι νηματώδεις είναι λεπτοί, επιμηκυμένοι, κυλινδρικής μορφής σκώληκες χωρίς μερισμό. Η επιδερμίδα είναι το εξωτερικό περίβλημα του νηματώδους, παρουσιάζει δε ειδικές μηχανικές ιδιότητες. Έτσι, αφενός προστατεύει το νηματώδη, αφετέρου είναι αρκετά εύκαμπτη ώστε να επιτρέπει τη σιγμοειδή-σπειροειδή κίνηση που παρατηρείται σ' αυτούς τους σκώληκες. Η σύσταση της επιδερμίδας παρουσιάζει αντιγονικές ιδιότητες, έτσι ώστε στο περιβάλλον των ιστών να παρουσιάζεται ο σκώληκας καλυμμένος επιφανειακά με συμπλέγματα αντιγόνου-αντισώματος. Εξαιτίας του ομοιόμορφου τους σχήματος μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από άλλες ομάδες σκωλήκων, αλλά ο καθορισμός του είδους στο οποίο ανήκει ο καθένας είναι περίπλοκος. Οι νηματώδεις έχουν ένα πλήρες πεπτικό σύστημα με στόμα, οισοφάγο, έντερα και πρωκτό. Κύρια κριτήρια για την ταυτοποίηση του είδους τους είναι το μέγεθος, η ακραία δομή του κεφαλιού και της ουράς, η θέση του εκκριτικού



Εικόνα 1. Εικόνα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης από προνύμφη νηματώδους *Anisakis* κατά τη διάτρηση εντερικού τοιχώματος *in vitro*. (J. Parasitol. , 1990 και DH Connor, FW Chandler : Pathology of Infectious diseases, 1997)

πόρου και η δομή της ενδιάμεσης περιοχής μεταξύ του οισοφάγου και των εντέρων. Τα περισσότερα από τα κριτήρια αυτά ισχύουν και για τα μεγαλύτερα στάδια της προνύμφης (Möller and Anders, 1986). Οι προνύμφες των νηματωδών εντοπίζονται συνήθως στα θαλάσσια τελεόστεα και βρίσκονται κυρίως πάνω

και μέσα στα σπλάχνα τους αλλά και μέσα στο μυϊκό τους ιστό. Η προνύμφη μολύνει το ψάρι όταν αυτό τρέφεται με μολυσμένη επίσης από νηματώδεις λεία

σπονδυλωτών ή ασπόνδυλων. Όταν απελευθερωθούν στο πεπτικό σύστημα του ψαριού καθίστανται ικανοί για διάτρηση των τοιχωμάτων του, φτάνοντας έτσι στη σωματική κοιλότητα και το μυϊκό σύστημα (Berland, 1989). Η ανάπτυξη των παρασιτικών νηματωδών περιλαμβάνει τέσσερα στάδια προνύμφης, L1 έως L4, και ένα στάδιο ενηλίκου. Κατά μία πιο αυστηρή έννοια, τα τέσσερα πρώτα στάδια δεν είναι προνύμφες αλλά νεαρά άτομα καθώς δε συμβαίνει κάποιο φαινόμενο μεταμόρφωσης. Το αυγό του νηματώδους αποβάλλεται συνήθως

με τα κόπρανα του ξενιστή ενώ η ανάπτυξή του επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία του ύδατος (Möller and Anders, 1986). Σε πολλά είδη τα στάδια I και II της προνύμφης αναπτύσσονται εκτός ξενιστή στο αυγό ενώ το στάδιο III εκκολάπτεται στους ενδιάμεσους ξενιστές. Προνύμφες του σταδίου αυτού είναι είτε ελεύθερες ή κλεισμένες στα τοιχώματα του στομάχου, στην επιφάνεια, μέσα ή μεταξύ οργάνων της σωματικής κοιλότητας ή στο μυϊκό ιστό αλλά ποτέ στην εντερική κοιλότητα. Ξενιστής μεταφορέας που τρώει τον προηγούμενο ξενιστή μπορεί κατ'επανάληψη να μεταφέρει τις προνύμφες του τρίτου σταδίου. Όταν εισαχθούν στο στομάχι του κατάλληλου τελικού ξενιστή, το στάδιο αυτό ωριμάζει στο IV και σύντομα μετά σε θηλυκό ή αρσενικό ενήλικα (Möller and Anders, 1986).

Το φύλο Nematoda αποτελείται από δύο τάξεις: Adenophorea και Secernentea (Anderson *et al.*, 1974). Οι νηματώδεις που σχηματίζουν την υπεροικογένεια Ascaridoidea (Railliet and Henry, 1915) είναι μέλη της δεύτερης τάξης. Μέλος αυτής της υπεροικογένειας αποτελεί η οικογένεια Anisakidae (Hartwich 1974; Anderson 1992).

Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 3 υποοικογένειες, τις: Goeziinae, Anisakinae και Raphidascarinae. Η υποοικογένεια Anisakinae (Railliet and Henry, 1912) περιλαμβάνει τα ακόλουθα γένη κατά Anderson (1992): *Anisakis* (Dujardin, 1845), *Pseudoterranova* (Mozzgonoi, 1951), *Contracaecum* (Railliet and Henry, 1912), *Phocascaris* (Host, 1932), *Hysterothylacium* and *Sulcascaris* (Hartwich, 1932).

### 1.1.1 Γένος *Anisakis*

Το 1985 ο Dujardin πρότεινε το γένος *Anisakis* ως μέρος του γένους *Ascaris* (Linnaeus, 1758) για συγκεκριμένες μορφές παρασίτων. Ο Baylis, (1920 σε Davey, 1971) σε μία ανασκόπηση της ταξινόμησης των Ascaridae, καθόρισε τη γενική θέση του *Anisakis* με τα *Peritrachelius* (Diesing, 1851) και *Conocephalus* (Diesing, 1860) ως συνώνυμα. Ο Yamaguti (1961 σε Davey, 1971) χρησιμοποίησε για το γένος το όνομα *Filocapsularia* (Deslongchamps, 1845). Όπως όμως παρατήρησε ο Khalil (1969 σε Davey, 1971) κάτι τέτοιο δεν ήταν αποδεκτό εφόσον οι Baylis και Daubney (1926 σε Davey, 1971), κατέταξαν το *Filocapsularia* ως μια αθροιστική ομάδα νηματωδών, κυρίως σε μορφή προνύμφης, που θεωρούσαν χωρίς γενική θέση ή καθορισμένο γενότυπο. Η ίδια περιγραφή ισχύει για τη χρήση του *Stomachus* (Zeder, 1980) αντί για το *Anisakis* που προτάθηκε από τους Johnston και Mawson (1945 σε Davey, 1971). Τα ονόματα *Filocapsularia* και *Stomachus* παρέμειναν αχρησιμοποίητα για πάνω από πενήντα χρόνια κάτι που επιτρέπει τη θεώρησή τους ως ξεχασμένα ονόματα (*nomen oblitum*) σύμφωνα με το άρθρο 23 (b) του ICBN, International Code of the Zoological Nomenclature που έγινε αποδεκτό από το 15<sup>ο</sup> Διεθνές Συνέδριο Ζωολογίας (σε Davey, 1971).

Σύμφωνα με τους Williams και Jones (1994) η ταξονομική θέση του γένους *Anisakis* είναι η ακόλουθη:

Phylum Nematoda – Class Secernentea – Order Ascaridida – Superfamily Ascaridoidea – Family Anisakidae – Subfamily Anisakinae – Tribe Anisakinea – Genus *Anisakis* (Dujardin, 1845).



Ο Davey (1971) συμπέρανε, μετά από λεπτομερή εξέταση του βαθμού απόκλισης σε κάθε άτομο σε σχέση με τους ταξονομικούς χαρακτήρες, ότι μέσα στο γένος *Anisakis* υπήρχαν τρία μόνο ισχύοντα είδη (με 14 συνώνυμα ανάμεσά τους) και τέσσερα ακόμη αμφισβητούμενα λόγω ανεπαρκών στοιχείων. Τα είδη αυτά είναι:

- Ισχύοντα είδη
  1. – *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809; det Krabbe, 1878) – 10 συνώνυμα
  2. – *Anisakis typica* (Diesing, 1806) – 1 συνώνυμο
  3. – *Anisakis physeteris* (Baylis, 1923)
- Αμφισβητούμενα είδη
  1. – *Anisakis dussumierii* (van Beneden, 1870), από ένα δελφίνι στον Ινδικό Ωκεανό κοντά στις Μαλδίβες.
  2. – *Anisakis schupakovi* (Mozgovoι, 1951), από την Κασπία θάλασσα
  3. – *Anisakis alexandri* (Hsü and Hoerpli, 1933) από τη θάλασσα της Κίνας
  4. – *Anisakis insignis* (Diesing, 1851) από *Inia geoffrensis* σε ποταμούς της Νοτίου Αμερικής.

Οι μορφολογικοί χαρακτήρες κατά σειρά προτεραιότητας για τον καθορισμό των τριών ειδών όπως ονομάζονται από τον Davey (1971) είναι οι συζευκτικές άκανθοι των αρσενικών (spicule), οι αισθητήριες θηλές (papillae), η μορφή του στομαχιού (ventriculus), η θέση του γενετικού πόρου (vulva) και η μορφή των χειλιών. Για το *Anisakis simplex* ο Davey (1971) έκανε τις ακόλουθες μορφολογικές παρατηρήσεις: Το μέγεθος των ακάνθων των αρσενικών ήταν σταθερά άνισο (δεξιά 1,25mm έως 2,35mm και αριστερό 1,75 έως 3,75mm). Μεγαλύτερα δείγματα είχαν γενικά μακρύτερες ακάνθους. Το πηλίκιο μήκους δεξιά προς αριστερή άκανθο επομένως κυμαινόταν από 1 : 1,17 έως 1 : 2,35, με ένα μέσο όρο της τάξης του 1 : 1,6. Οι θηλές βρέθηκαν να αποτελούνται από μια ομάδα 4 ζευγαριών κοντά στην άκρη της ουράς, διαχωρισμένες από ένα κενό, συνήθως 2 ή 4 ζεύγη ακριβώς πίσω από τον πρωκτό. Το στομάχι του είδους αυτού ήταν συνήθως αλλά όχι πάντα σιγμοειδές. Η ένωση οισοφάγου-στομάχου ήταν ενδεικτική μιας δομής σφιγκτήρα, κάτω από την οποία το στομάχι είναι ένας αγωγός λεπτών τοιχωμάτων που συνδέεται σε οξεία γωνία με το έντερο.

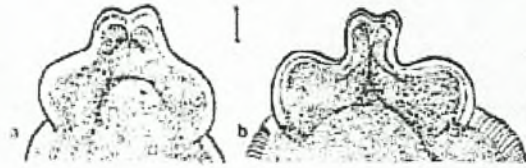
Ένα ευρύ τμήμα βάσης διαχωρίζει το ραχιαίο χείλος εν αντιθέσει με την κυλινδρική βάση κάθε κοιλιοπλευρικού χείλους. Κάθε χείλος έχει μια δίλοβη μπροστινή προβολή με τη μορφή θηλών σε σχήμα δοντιού μία σε κάθε άκρη, ενώ το κοιλιοπλευρικό χείλος έχει μία τέτοια προβολή.

Ο γενετικός πόρος των θηλυκών βρίσκεται πάντα κοντά στο κεντρικό σημείο του σώματος.

Για το είδος του *Anisakis typica* κύρια παρατήρηση αποτέλεσε η χαρακτηριστική δομή ακάνθων των αρσενικών οι οποίες παρουσιάζονται με μεγάλη ανομοιότητα μεγέθους (δεξιά 0,7mm έως 1,5mm, αριστερή 2,20mm έως 3,90mm) με το μέσο όρο πηλίκου δεξιά προς αριστερή να βρίσκεται περίπου στο 1 : 3, παρουσιάζοντας καθαρή απόκλιση από το 1 : 1,6 του *Anisakis simplex*.

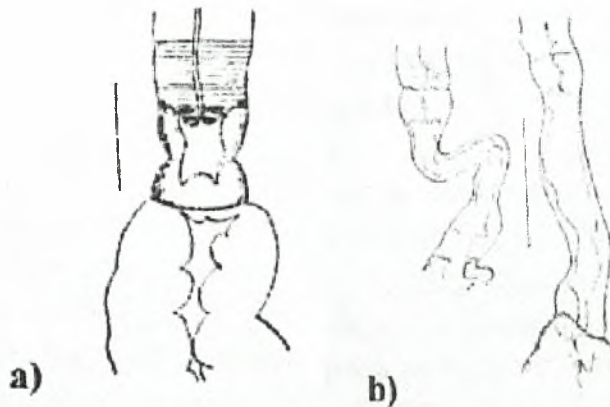
Οι θηλές στο είδος αυτό είναι επίσης διαφορετικές. Υπάρχουν μόνο τρία ζεύγη κοντά στην άκρη της ουράς αλλά και ένας μεταβλητός αριθμός μεταξύ πέντε και οκτώ ζευγών μικρών θηλών κοντά στον πρωκτό. Το στομάχι δεν είναι πολύ διαφορετικό από αυτό του *Anisakis simplex*. Τα χείλη του *Anisakis typica* διαφοροποιούνται από αυτά του προηγούμενου είδους, με εκείνα της μπροστινής προβολής του ραχιαίου τμήματος να εμφανίζονται πιο αποκομμένα από το βασικό τμήμα του κεφαλιού. (Davey, 1971)





Εικόνα 2. Χείλη a) ραχιαίο χείλος *A.simplex*; b) ραχιαίο χείλος *A.typica* (απο Davey, 1971)  
κλίμακα 0,1mm

Το *Anisakis Physeteris* διακρίνεται εύκολα από τα προηγούμενα δύο είδη. Οι άκανθοι των αρσενικών δεν ξεπερνούν σε μέγεθος τα 0,4mm, ενώ η διαφορά μεγέθους μεταξύ τους είναι ελάχιστη με το λόγο αυτής να είναι περίπου 1: 1,12. Οι αισθητήριες θηλές αποτελούνται από 4 ζεύγη κοντά στην άκρη της ουράς, αλλά μόνο ένα ή δύο ζεύγη, που μπορεί να είναι διπλά, κοντά πίσω από τον πρωκτό. Το σχήμα του στομάχου είναι επίσης διαφορετικό από τα άλλα δύο είδη καθώς είναι κοντό και ποτέ σιγμοειδές. Έχει την ίδια δομή σφιγκτήρα στην ένωσή του με τον οισοφάγο αλλά το τμήμα με λεπτά τείχη που απομένει είναι πολύ πιο κοντό. Ολόκληρο το στομάχι μπορεί να είναι ευρύτερο του μήκους του. Αναφορικά με τα χείλη δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά διαχωρισμού από τα δύο άλλα είδη ενώ ο γεννητικός πόρος βρίσκεται στο πρώτο τρίτο του σώματος (Davey, 1971; Smith and Wootten, 1978).



Εικόνα 3. Στομάχι a) *A.physeteris* (κοντό και ποτέ σιγμοειδές) b) *A.typica* και *A.simplex* (λεπτή και μακριά κοιλότητα που ενώνεται σε γωνία με το έντερο, Davey, 1971)

Για τις προνύμφες νηματωδών στο L3 στάδιο, που συχνότερα συναντώνται στα τελεόστεα, είναι δύσκολο να καθοριστεί σε ποιο είδος ανήκουν, αναλογιζόμενοι πως και για τον καθορισμό του είδους ενηλίκων απαιτείται συνδυασμός μορφολογικών χαρακτηριστικών με γενετική ανάλυση.

Ο Berland (1961) αναγνώρισε δύο είδη προνύμφης *Anisakis* που υποδείχθηκαν ως προνύμφη τύπου I και προνύμφη τύπου II. Η προνύμφη τύπου II είναι διακριτή από την κοινή προνύμφη τύπου I, με το στομάχι και την ένωση στομάχου-εντέρου να είναι πιο κοντά από αυτά της τύπου I, η ένωση στομάχου εντέρου δε γίνεται υπό γωνία και η ουρά είναι κωνική. (Berland, 1961)

Η ανάλυση της γενετικής δομής παρασιτικών νηματωδών παρείχε ενδιαφέροντα αποτελέσματα σε επίπεδο ταξινόμησης ειδών. Εφαρμόζοντας τέτοια προσέγγιση στο γένος *Anisakis* προσδιορίστηκε πως η προνύμφη τύπου I (Berland, 1961) αντιστοιχούσε στο *Anisakis Simplex*, ενώ η τύπου II (Berland, 1961) στο *Anisakis physeteris* (Paggi et al., 1983; Mattiucci et al., 1986).

Η γενετική δομή του *Anisakis physeteris* βρέθηκε αρκετά διαφοροποιημένη από αυτή του συμπλόκου *Anisakis simplex*. Η πολύ μεγάλη γενετική απόκλιση μεταξύ των ειδών υποδεικνύει μια αρκετά παλιά εξελικτική διαφοροποίηση από τον κοινό τους πρόγονο (Mattiucci et al., 1986). Στο σύμπλοκο του *Anisakis simplex* δε, περιλαμβάνονται 3 διαφορετικά είδη: *A. simplex sensu stricto* (s.s.), *A. pegreffii* και *A. simplex C* (Mattiucci et al., 1997).

Με τη χρησιμοποίηση γενετικών δεικτών για την αναγνώριση των ειδών, δείχθηκε ότι σε διάφορες ταξονομικές ομάδες περιλαμβάνεται ένας αριθμός μορφολογικά παρόμοιων ειδών τα οποία διαφέρουν όμως αρκετά στη γενετική δομή και τις οικολογικές συνθήκες (αδελφά είδη) και τα οποία σε συμπατρία αποδεικνύονται αναπαραγωγικά απομονωμένα. (έλλειψη γενετικής ροής παρά τα περιστασιακά υβρίδια της F<sub>1</sub>). Στο *Anisakis simplex sensu lato*, εντοπίστηκαν δύο αναπαραγωγικά απομονωμένα, αδελφά είδη, τα οποία αρχικά ονομάστηκαν *Anisakis simplex A* και *Anisakis simplex B* και αργότερα *Anisakis pegreffii* και *Anisakis simplex sensu stricto* (Nascetti et al., 1983, 1986).

Πρόσφατες έρευνες σε δείγματα από περιοχές του βορά και της Αυστραλίας αποκάλυψαν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα, με νέες διακριτές γενετικές δεξαμενές σε δείγματα που μοιάζουν μορφολογικά με το *Anisakis simplex* τόσο στην προνύμφη (τύπος I κατά Berland, 1961) όσο και στα ενήλικα άτομα (Mattiucci et al., 1997). Οι ερευνητές αυτοί εντόπισαν μια νέα διακριτή γενετική δεξαμενή μέσω ισοενζυμικής ανάλυσης, με τα δείγματα που ανήκαν εκεί να διακρίνονται σε ένα νέο είδος το *Anisakis simplex C*. Το είδος αυτό έδειξε το μεγαλύτερο μέσο όρο τιμών γενετικής διαφοροποίησης σε σχέση τόσο με το *Anisakis simplex s.s.* όσο και με το *Anisakis pegreffii* (Mattiucci et al., 1997).

Σε οικολογική βάση μόνο, το είδος *Anisakis schupakovi* θα μπορούσε να θεωρηθεί έγκυρο δεδομένου ότι ο ξενιστής του (*Phoca caspica*) είναι ένα γεωγραφικά απομονωμένο σπάνιο είδος στην Κασπία θάλασσα. Ο Mokhayer (1974 σε Smith and Wootten, 1978) αναφέρεται σε προνύμφες *Anisakis schupakovi* σε νεαρές φώκιες της Κασπίας.

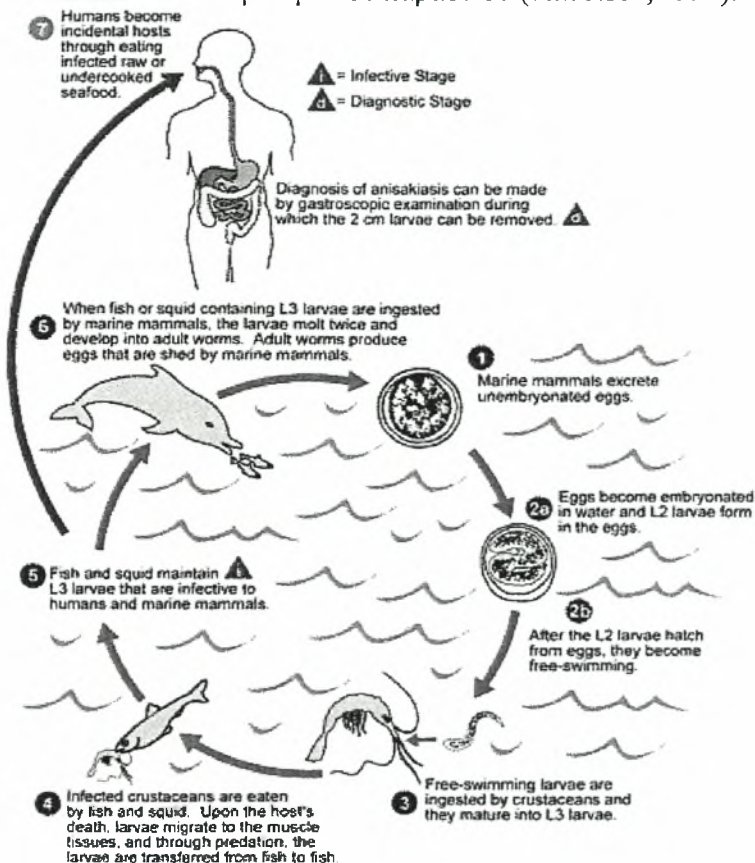
Το 1998, η Lia Paggi και οι συνεργάτες αναγνώρισαν ένα νέο είδος του *Anisakis*, μορφολογικά διαφορετικό από όλα τα άλλα είδη που περιγράφηκαν από τον Davey (1971). Αυτό το είδος, *Anisakis ziphidarum*, είναι αρκετά διαφοροποιημένο γενετικά και μορφολογικά από άλλα είδη *Anisakis*. Ο εκτιμώμενος χρόνος εξελικτικής απόκλισης του είδους αυτού από το σύμπλοκο του *Anisakis simplex* είναι τουλάχιστον 8 εκατομμύρια χρόνια (από δεδομένα γενετικής απόστασης) ενώ το *Anisakis physeteris* φαίνεται να έχει αποκλίνει από τα άλλα είδη που εξετάζονται εδώ πριν τουλάχιστον 15 εκατομμύρια χρόνια. Η εξέλιξη του *Anisakis ziphidarum* μπορεί να έχει προκληθεί παράλληλα με τη διαφοροποίηση κητοειδών της οικογένειας Ziphidae, τα οποία αποτελούν και τους μόνους τελικούς ξενιστές στους οποίους έχει μέχρι τώρα εντοπιστεί το είδος αυτό (Paggi et al., 1998).

Μέχρι και σήμερα, στο γένος *Anisakis* έχουν αναγνωριστεί και ανήκουν τα είδη: *Anisakis simplex sensu stricto*, *Anisakis simplex C*, *Anisakis pegreffii*, *Anisakis physeteris*, *Anisakis ziphidarum*, *Anisakis brevispiculata*, *Anisakis typica* και *Anisakis schupakovi* (Nascetti et al., 1986; Orecchia et al., 1986; Mattiucci et al., 1997; Paggi et al., 1998).

Ο κύκλος ζωής ενός τυπικού νηματώδους περιλαμβάνει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά τέσσερα αναπτυξιακά στάδια ωρίμανσης:

Αυγό-Προνύμφη πρώτου σταδίου-Προνύμφη δευτέρου σταδίου-Προνύμφη τρίτου σταδίου-Προνύμφη τετάρτου σταδίου-Πέμπτο στάδιο: Ενήλικας

Κατά τους Williams and Jones (1994) οι πρώτοι ενδιάμεσοι ξενιστές του *Anisakis* είναι τα οστρακόδερμα, οι δεύτεροι τα καλαμάρια και τα ψάρια (ειδικά τα τελεόστεα) και τελικοί ξενιστές είναι τα θαλάσσια θηλαστικά (πτερυγωτά και κήτη). Εκτός αυτών των φυσικών ξενιστών, χαρακτηριστικοί του κύκλου ζωής τέτοιων παρασίτων αποτελούν και άλλοι " τυχαίοι " ξενιστές, που μολύνονται με το παράσιτο τρώγοντας ψάρια φορείς. Σε περίπτωση μόλυνσης με πληθυσμούς προνύμφης, στον τυχαίο ξενιστή αυτές μπορεί είτε να μην αναπτυχθούν καθόλου, είτε να φτάσουν στο τέταρτο στάδιο πριν την ενηλικίωση. Σε κάθε περίπτωση όμως τελικά πεθαίνουν αποτελώντας μια απώλεια στον πληθυσμό του παρασίτου (Anderson, 1993).



Εικόνα 4. Κύκλος ζωής των *Anisakis* και *Pseudoterranova* (από CDC / [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx))

Ορισμένοι Ιάπωνες ερευνητές (π.χ. Oshima, 1972 σε Smith & Wootten, 1978) πιστεύουν πως ένα στάδιο ωρίμανσης συμβαίνει σε οστρακόδερμο ξενιστή αλλά υπάρχει έλλειψη πειραματικών δεδομένων (Smith & Wootten, 1978). Πιο πρόσφατες μελέτες (Smith, 1983) δείχνουν ότι: α) μόνο μία ωρίμανση συμβαίνει εντός του αυγού β) οι L2 που εκκολάπτονται, βρίσκονται χωρίς κάλυμμα όταν πέπτονται από οστρακόδερμα και αναπτύσσονται σε L3 γ) τα ψάρια και τα καλαμάρια αποτελούν μόνο καταφύγιο των L3 και χρησιμεύουν στο να διασπείρουν τις προνύμφες στο χώρο ανά διαστήματα. Τα θαλάσσια θηλαστικά χρησιμεύουν ως τελικοί ξενιστές για τις L3, L4 και τα σεξουαλικά ενεργά ενήλικα αρσενικά και θηλυκά. Τα αυγά αποβάλλονται με τα κόπρανα των τελικών ξενιστών, και η εμβρυογένεση και η εκκόλαψη γίνεται μέσα στη θάλασσα. Αν οι υποθέσεις αυτές είναι σωστές, οι L3 στα οστρακόδερμα μπορούν να είναι απ ευθείας μολυσματικές για τους τελικούς ξενιστές και τα στοιχεία δείχνουν πως κάτι τέτοιο ισχύει. Για παράδειγμα, η μπλε φάλαινα *Balaenoptera musculus* τρέφεται σχεδόν αποκλειστικά με οστρακόδερμα (Gambell, 1979;



Mackintosh, 1965 σε Smith, 1983) και ο *Anisakis simplex* έχει αναφερθεί σε μόλυνση του είδους αυτού από νηματώδη (Davey, 1971).

Αν ένα στάδιο ωρίμανσης συμβαίνει εντός των οστρακόδερμων, τότε αυτοί είναι ενδιάμεσοι ξενιστές ενώ τα ψάρια και τα καλαμάρια παρατενικοί ξενιστές. Εφόσον κάτι τέτοιο ισχύει, οι προνύμφες από τα οστρακόδερμα πράγματι είναι μολυσματικές για τους τελικούς ξενιστές αν και πιστεύεται πως μία προσαρμογή της προνύμφης απαιτείται με τη μόλυνση ψαριών ή καλαμαριών πριν τον τελικό ξενιστή (Smith & Wootten, 1978).

Ο Chabaud (1971) έγραψε πως 'το φαινόμενο της ανάπτυξης ή της συσσώρευσης σε ανεπιθύμητο ξενιστή εξασφαλίζει τη μεταφορά της προνύμφης και παρά το ότι δεν είναι επιθυμητό σε μεγάλο βαθμό αναφορικά με τη φυσιολογία του σκώληκα, καθίσταται υποχρεωτικό από οικολογικής σκοπιάς για την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής του'. Τέτοιες θεωρήσεις μπορούν να εξηγήσουν την υπεραφθονία των *Anisakis simplex* L3 σε μια ποικιλία ειδών από ψάρια.

Η κατάσταση που είναι γνωστή ως ανισακίδωση, αποτελεί ασθένεια μεταδιδόμενη στον άνθρωπο μέσω κατανάλωσης θαλασσινών μολυσμένων από νηματώδεις των γενών *Anisakis* και *Pseudoterranova* σε στάδια προνύμφης. Άλλα γένη νηματωδών όπως *Hysterothylacium* και *Contracaecum* μπορεί επίσης να εμπλέκονται σε καταστάσεις ανθρώπινης ανισακίδωσης. Μολύνσεις ανθρώπων από τα παράσιτα αυτά μπορεί να προέλθουν μέσω κατανάλωσης ωμών, ελάχιστα ψημένων ή ακατάλληλα επεξεργασμένων ψαριών ή κεφαλόποδων, που αποτελούν παρατενικούς ξενιστές των νηματωδών αυτών. Κλινικά αναγνωρίζονται διάφοροι τύποι της ασθένειας βασισμένοι στο σημείο προσβολής (γαστρική, εντερική ή εξωγαστροεντερική) (D' Amelio et al., 2000) καθώς και σε ιστοπαθολογική ταξινόμηση (Kojima et al., 1966 σε D' Amelio et al., 2000). Όπως προαναφέρθηκε στον άνθρωπο εμφανίζεται τόσο γαστρική όσο και εντερική ανισακίδωση. Η κλινική εικόνα των δύο περιπτώσεων διαφέρει σε κάποια στοιχεία. Στην περίπτωση της γαστρικής ανισακίδωσης, παρουσιάζονται ξαφνικοί στομαχικοί πόνοι, ναυτία και εμετός 4-6 ώρες μετά την κατανάλωση του μολυσματικού φορέα. Η εντερική ανισακίδωση παρουσιάζει τα συμπτώματά της συνήθως σε διάστημα 7 ημερών από την κατανάλωση της μολυσμένης τροφής. Στην περίπτωση αυτή έχουμε την εμφάνιση έντονου πόνου στην περιοχή κάτω του στομάχου, συνοδευόμενου από ναυτία, εμετό, διάρροια και αίμα στα κόπρανα που δύσκολα όμως είναι δυνατό να ανιχνευθεί (Smith & Wootten, 1978). Στη γαστρική ανισακίδωση, τα κλινικά συμπτώματα εξαφανίζονται μετά από ενδοσκοπική αφαίρεση του αντιγόνου (προνύμφη). Στην περίπτωση της εντερικής μόλυνσης, αφαίρεση και μόνο της προνύμφης είναι δύσκολη αν δε γίνει με χειρουργική αφαίρεση εντερικού τμήματος. Επιπλέον, η αλλεργική αντίδραση του εντέρου στο αντιγόνο έχει ως αποτέλεσμα εκκρίσεις που οδηγούν σε σκλήρυνση του εντερικού τοιχώματος με επιπλέον αποτέλεσμα την επιμήκυνση της αποφρακτικής κατάστασης της εντερικής κοιλότητας μετά την προσβολή (Kikuchi et al., 1990).

Η διάγνωση της ανισακίδωσης στους ανθρώπους είναι δύσκολη καθώς αποτελεί ασθένεια άγνωστη σε πολλούς ιατρούς, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την ενδεχόμενη μεταχείριση των συμπτωμάτων της όμοια με εκείνη απλού στομαχικού έλκους, περιοχικής εντερίτιδας ή φλεγμονής της σκωληκοειδούς απόφυσης (Feldmeier 1991). Η ανισακίδωση αποτελεί ασθένεια σχετικά κοινή στην Ιαπωνία όπου έχουμε ευρεία κατανάλωση δημοφιλών πιάτων όπως το sushi και το sashimi. Κάθε χρόνο αναφέρονται εκεί διάφορες περιπτώσεις ενώ μέχρι το 1988 έχουν καταγραφεί περισσότερες των 11.000 (Möller, 1991a).



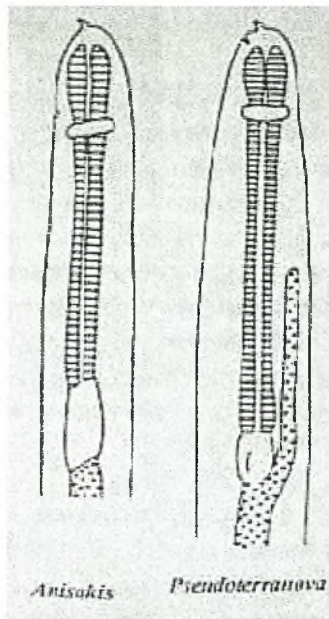
Εικόνα 5. Γαστροενδοσκοπική εικόνα προνύμφης *Anisakis* που αφαιρέθηκε από το πεπτικό σύστημα 51χρονης γυναίκας (από D' Amelio *et al.*, 1999)

Η ανάγκη αντιμετώπισης του *Anisakis* ως ανθρώπινου παθογόνου παράγοντα, έχει οδηγήσει σε έρευνες που εστιάζουν στον εντοπισμό της προνύμφης κυρίως στον ιστό του ψαριού και τη θανάτωσή της. Οι προνύμφες είναι άχρωμες και συνήθως συγκεντρωμένες σε ελικοειδή διάταξη διαμέτρου περίπου 3mm, πράγμα που καθιστά τον εντοπισμό τους μέσα στον ιστό εξαιρετικά δύσκολο (Smith and Wootten, 1978). Όπου αυτό καθίσταται αδύνατο, έχουμε την εφαρμογή τεχνικών προπαρασκευής του ψαριού που σκοτώνουν τις προνύμφες εντός των ιστών. Κάτι τέτοιο βασίζεται στην ευαισθησία του παρασίτου στην αφυδάτωση, τη θερμοκρασία, το άλας και το οξύ. Όπου η εφαρμογή τέτοιων συνθηκών δεν είναι επιθυμητή ή δυνατή, η βαθιά κατάψυξη των αλιευμάτων ή των προϊόντων τους είναι η αποτελεσματικότερη μέθοδος για τη λύση του προβλήματος της ανισακίδωσης. Σήμερα είναι κοινώς αποδεκτό πως κατάψυξη σε θερμοκρασία  $-18^{\circ}\text{C}$  για διάστημα 24 ωρών πρακτικά προκαλεί το θάνατο σε όλες τις προνύμφες νηματώδους που μπορεί να υπάρχουν στον ιστό του αλιεύματος (Möller, 1991b).

### 1.1.2 Γένος *Pseudoterranova*

Το γένος *Pseudoterranova* προτάθηκε αρχικά με το όνομα *Ascaris* L., από τον Krabbe το 1878. Αργότερα ο Baylis το τοποθέτησε στο *Porrocaecum* (Raillet & Henry, 1912) το οποίο θεωρήθηκε ως ένα παλιότερο συνώνυμο του *Terranova* (Johnston & Mawson, 1945). Το 1959, ο Mayers πρότεινε το γένος *Phocanema*, το οποίο όμως εγκαταλείφθηκε για να χρησιμοποιηθεί τελικά η ονομασία του Gibson (1983) *Pseudoterranova*. Στην παρούσα φάση, το γένος *Pseudoterranova* απαρτίζεται από οκτώ είδη: *P.kogiae* (Johnston & Mawson, 1939), *P.ceticola*, -με το παλιότερο όνομα *Terranova ceticola*- (Deardorff and Overstreet, 1981), *P.cattani* (George-Nascimento, 2000) καθώς και *P.decipiens* (Krabbe, 1878), σύμπλοκο αποτελούμενο από 5 βιολογικά είδη με τις ονομασίες *P.decipiens* (s.s.), *P.krabbei*, *P.bulbosa*, *P.azarasi* και *P.decipiens* E (Bullini *et al.*, 1997; Paggi *et al.*, 1991,2000; Mattiucci *et al.*, 1998)

Τα είδη του γένους *Pseudoterranova* παρουσιάζουν χαρακτηριστικές μορφολογικές διαφοροποιήσεις από αυτά του *Anisakis*, με το τμήμα του πεπτικού μετά το στομάχι να προεκτείνεται παράλληλα προς τον οισοφάγο (Εικόνα 6)



Εικόνα 6. - Νηματώδεις *Anisakis* και *Pseudoterranova*, διακρίνονται οι μορφολογικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των ειδών στο άνω πεπτικό σύστημα (Lia Paggi, unpublished data, 2000)

## 1.2 Η χρησιμοποίηση μοριακών εργαλείων για την ταυτοποίηση των νηματωδών

Για τον προσδιορισμό της μοριακής και βιοχημικής διαφοροποίησης μεταξύ ατόμων και πληθυσμών νηματωδών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα μοριακά εργαλεία (Anderson *et al.*, 1998) Οι μοριακές αυτές μέθοδοι περιλαμβάνουν ανάλυση του mtDNA καθώς και του πυρηνικού γενώματος. Στα πλαίσια της ανάλυσης του πυρηνικού γενώματος, συμπεράσματα μπορεί να εξαχθούν από τη μελέτη αλληλουχικής διαφοροποίησης, την απόκλιση στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες πυρηνικών περιοχών, τη μελέτη περιοχών ριβοσωμικού DNA και μικροδορυφόρων.

Τα εσωτερικά αντιγραφόμενα μεσοδιαστήματα των ριβοσωμικών γονιδίων ITS-1 και ITS-2 (Internal Transcribed Spacers), παρουσιάζουν μεγάλη διαφοροποίηση (Hills and Dixon, 1991 σε Anderson *et al.*, 1998), ως εκ τούτου οι αλληλουχίες των ITS καθώς και οι τεχνικές RFLP's (restriction fragment length polymorphisms) χρησιμοποιούνται ευρέως για την ταυτοποίηση συγγενικών ειδών νηματωδών. Η PCR-RFLP ανάλυση χρησιμοποιείται εκτεταμένα για την εύρεση της διαφοροποίησης γνωστών αλληλουχιών-στόχων δίνοντας χρήσιμους μοριακούς δείκτες διάκρισης γενών και ειδών παρασίτων.

Στην ενίσχυση με PCR βασίζεται και η ανάλυση των μίνι και μικροδορυφορικών περιοχών DNA. Οι περιοχές αυτές, που συναντώνται πολύ συχνά στο γένωμα των ευκαρυωτών, αποτελούνται από επαναλαμβανόμενα μικρά μοτίβα αλληλουχιών και είναι διασπαρμένες σ' όλο το γονιδίωμα του οργανισμού. Συνήθως δεν μεταφράζονται και διατηρούν τον πολυμορφισμό ως αποτέλεσμα συσσώρευσης μεταλλάξεων. Οι δορυφόροι χαρακτηρίζονται από αλληλική ποικιλομορφία στο μήκος των επαναλήψεων και έχουν χρησιμοποιηθεί στη μελέτη της γενετικής δομής πληθυσμών όπως και σε αναλύσεις σύνδεσης και γενετικής χαρτογράφησης (Tautz 1989, Love *et al.*, 1990). Χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για την ενίσχυση των



περιοχών αυτών μπορούμε έπειτα να τις αναλύσουμε με ηλεκτροφόρηση σε κλίση αποδιατακτικού.

Σε αντίθεση με την τεχνική της PCR η RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), βασιζόμενη στην ενίσχυση τυχαίων περιοχών γενωμικού DNA με τη χρησιμοποίηση εκκινητών τυχαίας αλληλουχίας (Williams et al., 1990) εφαρμόζεται επίσης στην ανάλυση του πολυμορφισμού της αλληλουχίας μεταξύ και μέσα σε πληθυσμούς παρασίτων. Η RAPD δεν απαιτεί εκ των προτέρων γνώση της αλληλουχίας του DNA. Η ανάλυση των τμημάτων ενίσχυσης που προκύπτουν από την τεχνική αυτή, μπορεί να οδηγήσει στον εντοπισμό ειδικών για κάθε άτομο ζωνών οι οποίες μπορούν έπειτα να καθαριστούν, να ενισχυθούν εκ νέου και να εξεταστούν για πολυμορφισμούς. Με τον εντοπισμό τέτοιων πολυμορφικών περιοχών, μπορούμε να οδηγηθούμε στο σχεδιασμό εκκινητών για ειδικές περιοχές που θέλουμε να ενισχύσουμε έπειτα με PCR.

Μία ακόμη τεχνική που εκτιμάται πως μπορεί να βρεί εφαρμογή στο διαχωρισμό παρασιτικών ειδών είναι αυτή της AFLP (Vos et al., 1995). Βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση περιοριστικών τμημάτων από την ολική πέψη του γενωμικού DNA και περιλαμβάνει : Πέψη του DNA και ένωση των προϊόντων με ολιγονουκλεοτιδικούς προσαρμογείς, επιλεκτική ενίσχυση ομάδων των τμημάτων πέψης και ανάλυση σε gel των ενισχυμένων τμημάτων. Η εκλεκτικότητα της μεθόδου έγκειται στην ενίσχυση των τμημάτων των οποίων η αλληλουχία ταιριάζει με εκείνη των εκκινητών που χρησιμοποιούνται και οι οποίοι προσδένονται στα ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα και στην αρχή της αλληλουχίας των θραυσμάτων του DNA. Ως μέθοδος DNA fingerprinting καθίσταται σαφές πως μπορεί να αποδειχτεί πολύ χρήσιμη και στη μελέτη ειδών και πληθυσμών παρασίτων.

Και άλλες όμως μέθοδοι ανάλυσης είναι χρήσιμες ώστε να γίνει δυνατός ο προσδιορισμός της διαφοροποίησης των αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών ατόμων και μετά συνήθως από τη χρησιμοποίηση της PCR, η οποία αποτελεί απαραίτητο σχεδόν μέσο για την ταυτοποίηση ειδών παρασίτων. Έτσι λοιπόν η αλληλούχιση γονιδίων αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τον ακριβή χαρακτηρισμό παρασιτικών ειδών καθώς και για άλλες συστηματικές μελέτες (π.χ. Johnson and Baverstock, 1989; McManus and Bowles, 1996). Άλλες τεχνικές ελέγχου άμεσης ανάλυσης γενετικής διαφοροποίησης αποτελούν οι PCR βασιζόμενες μέθοδοι ελέγχου μεταλλάξεων όπως η DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) και η SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Η DGGE περιλαμβάνει ηλεκτροφόρηση τμημάτων DNA σε υψηλή θερμοκρασία (50-60°C) σε gel ακρυλαμίδης με βαθμιδωτή συγκέντρωση αποδιατακτικού. Αρχή της μεθόδου αποτελεί η ιδιότητα της επιρροής των νουκλεοτιδικών διαφοροποιήσεων στην αλλαγή της ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς του DNA μετά από θέρμανση και επίδραση με αποδιατακτικό. Το σημείο στο gel στο οποίο το DNA θα σταματήσει καθώς θα έχει αποδιαταχθεί πλήρως, εξαρτάται από την αλληλουχία και τη σύσταση των βάσεων του. Έτσι τμήματα DNA ίδιου μεγέθους, διαφορετικής όμως σύστασης ακόμη και σε ένα νουκλεοτίδιο θα σταματήσουν σε διαφορετικά σημεία πάνω στο gel. Η μέθοδος αυτή έχει ήδη βρεί μεγάλη εφαρμογή στην μελέτη χαρακτηρισμού παρασιτικών ειδών (π.χ. Gasser, 1996a;1998e;Abrams and Stanton 1992), με τον έλεγχο περιοχών όπως αυτή των ITS. Η SSCP μέθοδος, βασιζόμενη στην εξάρτηση της ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς μονόκλωνων μορίων DNA από τη δομή και το μήκος τους, έχει βρεί επίσης μεγάλη εφαρμογή σε ανάλογα θέματα της παρασιτολογίας (π.χ. Gasser, 1997;1998a;Zhu et al.,1998a,b,c;Liu and Sommer, 1995). Διαλυτοποιημένα τα μονόκλωνα τμήματα DNA παίρνουν δευτεροταγείς και τριτοταγείς διαμορφώσεις λόγω αλληλεπίδρασης των βάσεων του ίδιου κλώνου, οι οποίες εξαρτώνται από το

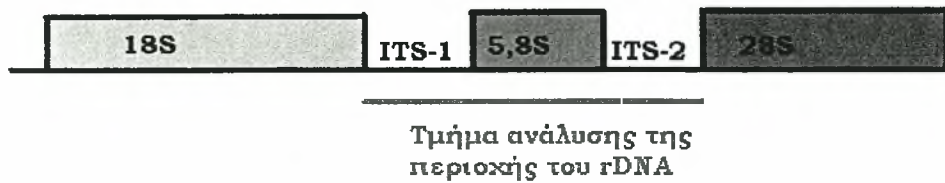
μήκος του μορίου και την πρωτοταγή του διαμόρφωση. Κάτι τέτοιο έχει ως αποτέλεσμα μεταλλάξεις ακόμη και σε ένα νουκλεοτίδιο να προκαλούν διαφορετικές διαμορφώσεις των οποίων η κινητικότητα στο gel πολυακρυλαμιδίου διαφέρει και τελικά ανιχνεύεται.

Οι DNA τεχνολογίες της μοριακής βιολογίας παρουσιάζουν σημαντικό αντίκτυπο σε πολλούς τομείς της παρασιτολογίας, συμπεριλαμβανομένων αυτών της ταυτοποίησης και συστηματοποίησης των παρασίτων, της διάγνωσης ασθενειών που προκαλούν, της επιδημιολογίας τους, της ανάλυσης του γενετικού προφίλ πληθυσμών τους, της αποκάλυψης του τρόπου έκφρασης και οργάνωσης γονιδίων τους καθώς και της μελέτης για την ανθεκτικότητα τους σε φάρμακα και την ανάπτυξη κατάλληλων εμβολίων (Gasser, 1999). Η ακριβής ταυτοποίηση νηματώδων της οικογένειας Apisakiidae σε κάθε στάδιο του κύκλου ζωής τους αποτελεί σημαντικό στοιχείο για τη διάγνωση των ασθενειών που προκαλούν σε ανθρώπους και ζώα και αποτελεί με τον τρόπο αυτό σημαντικό στοιχείο ελέγχου και εποπτείας της ασθένειας. Σε πολλές περιπτώσεις η ακριβής διάγνωση ανισακιδώσεως σε διαφορετικά είδη ξενιστές παρουσιάζει σημαντικά εμπόδια κυρίως ως αποτέλεσμα αδυναμίας χρήσης μορφολογικών χαρακτήρων για την ταυτοποίηση των σταδίων της *ηρόνωσης* και όταν μόνο μικρά κομμάτια του νηματώδους είναι διαθέσιμα για εξέταση (Zhu *et al.*, 1998). Συγκεκριμένα, η αρωγή τεχνικών όπως η PCR έχει φέρει επανάσταση στην έρευνα της παρασιτολογίας και έχει βρει μεγάλη εφαρμογή σ' αυτή επειδή η ευαισθησία της επιτρέπει την ενίσχυση γονιδίων ή γονιδιακών τμημάτων από ελάχιστα ποσά παρασιτικού υλικού. Κάτι τέτοιο είναι μεγάλης σημασίας καθώς καθίσταται συχνά αδύνατη η απομόνωση και κτήση επαρκούς ποσότητας υλικού, ορισμένων παρασίτων και σε κάποια στάδια του κύκλου ζωής τους, για συμβατικές μοριακές αναλύσεις (Gasser, 1999).

### 1.2.1 Ανάλυση περιοχών ριβωσωμικού DNA (Ribosomal DNA spacers)

Η περιοχή του rDNA στους ευκαρυώτες αποτελεί μία μεγάλη πολυγονιδιακή οικογένεια, αποτελούμενη από κατά σειράν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ενώ κάθε τμήμα της περιλαμβάνει τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις 18S, 5,8S και 28S υπομονάδες του rRNA όπως επίσης και περιοχές αλληλουχιών που διαχωρίζουν τις κωδικοποιούσες περιοχές. Συνήθως, οι αλληλουχίες αυτές σ' ένα άτομο, εξελίσσονται σε συντεταγμένους ρυθμούς με το είδος του, οδηγώντας σε ομογενοποίηση της αλληλουχίας εντός του είδους και διαφοροποίησή της μεταξύ των ειδών. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται 'σύμφωνη εξέλιξη' (van Herwerden *et al.*, 2000). Σαν αποτέλεσμα της 'σύμφωνης εξέλιξης', το rDNA μπορεί να δώσει χρήσιμους γενετικούς δείκτες για τα είδη των παρασίτων. Ο πολυμορφισμός στις ITS περιοχές του rDNA μεταξύ των ειδών μπορεί να είναι χαμηλός, ωστόσο, κάποιες ομάδες παρασίτων επιδεικνύουν σημαντική ετερογένεια αλληλουχίας και μήκους της περιοχής αυτής, αντικατοπτρίζοντας τη διαφοροποίηση του πληθυσμού. Η ετερογένεια της αλληλουχίας σε άλλες περιοχές του rDNA μπορεί επίσης να εκμεταλλευθεί μελετώντας τη γενετική δομή των παρασιτικών πληθυσμών (Gasser, 1999). Οι αλληλουχίες ITS και οι RFLP's βρίσκουν ευρεία εφαρμογή κυρίως στο διαχωρισμό στενά συγγενικών ειδών νηματώδων.

Στην παρακάτω Εικόνα 7 φαίνεται σχηματικά η περιοχή του rDNA των ευκαρυωτικών κυττάρων των παρασίτων.



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση διάταξης γονιδίων rDNA.

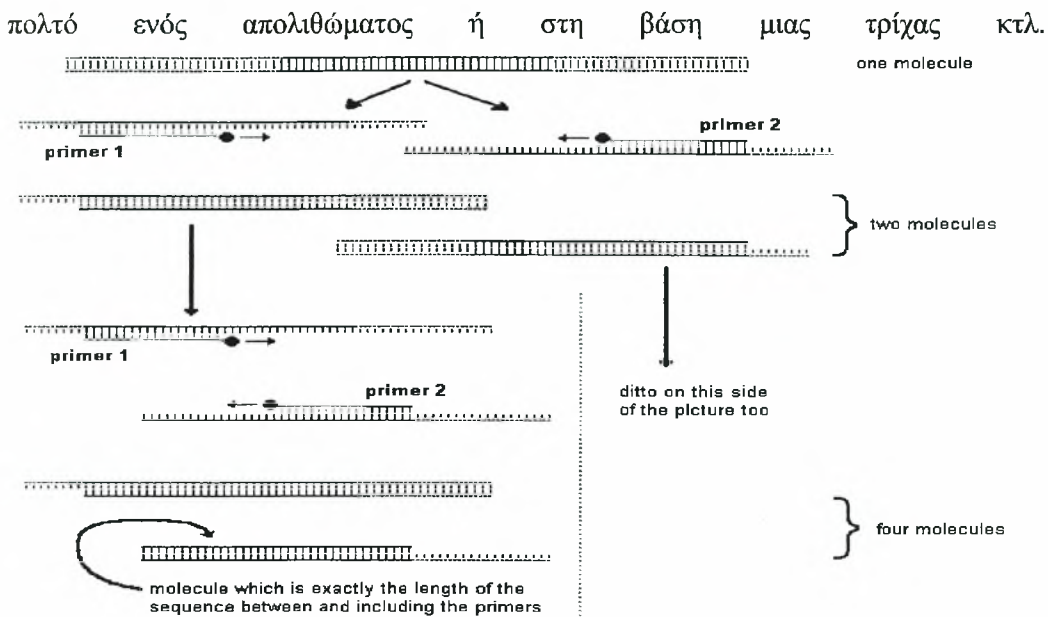
Το τμήμα του rDNA που υποδεικνύεται και περιλαμβάνει τις περιοχές μεταξύ των υπομονάδων καθώς και την κωδικοποιούσα περιοχή για τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα μπορεί να αναλυθεί και να δώσει χρήσιμες πληροφορίες για τη διάκριση ειδών παρασίτων, συμπεριλαμβανομένων αυτών της οικογένειας Anisakidae. Ενίσχυση με PCR της περιοχής αυτής και κατόπιν πέψη των προϊόντων με ένζυμα περιορισμού μπορεί να δώσει χαρακτηριστικά πρότυπα ταυτοποίησης ειδών του γένους *Anisakis* (D'Amelio et al., 2000).

Η εύρεση της αλληλουχίας της περιοχής αυτής, δεδομένου του πολυμορφισμού που παρατηρείται κυρίως στα τμήματα ITS-1 και ITS-2 είναι επίσης χρήσιμη και ενδεικτική της εξελικτικής απόκλισης μεταξύ ειδών παρασίτων ακόμη και του ίδιου γένους. Με τη βοήθεια κατάλληλων προγραμμάτων ανάλυσης της αλληλουχίας βάσεων, μπορούν να κατασκευαστούν φυλογενετικά δένδρα που θα δείχνουν τις εκτιμώμενες εξελικτικές σχέσεις των ατόμων που εξετάζονται ανα περίπτωση.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τις ιδιότητες της περιοχής αυτής που προαναφέρθηκαν, γνώση της αλληλουχίας της σε συνδυασμό με εφαρμογή RFLP ανάλυσης μπορεί να δώσει μία αρκετά σαφή και αξιόπιστη εικόνα σε σχέση με τη διάκριση ειδών των παρασίτων που μελετούμε.

### 1.2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)

Η μέθοδος της PCR επιτρέπει την εκλεκτική ενίσχυση συγκεκριμένου τμήματος DNA (μέχρι ~ 10 Kbp σε μέγεθος), που επιλέγεται μέσω ενός περίπλοκου γενώματος από *in vitro* ενισχυτική ενζυμική δράση. Η PCR απαιτεί τη χρήση ειδικού μηχανήματος ταχείας ψύξης και θέρμανσης των δειγμάτων, στις άριστες θερμοκρασίες που απαιτούνται: για την αποδιάταξη των κλώνων του DNA (95°C), την πρόσδεση των εκκινήτων (55-65°C), και τον πολυμερισμό του DNA (72°C). Η πηγή του καλουπιού DNA μπορεί να είναι είτε καθαρό DNA ή μη επεξεργασμένο νουκλεϊκό οξύ π.χ. με τη μορφή που βρίσκεται μετά από *in situ* λύση κυττάρων, στον



Εικόνα 8. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Molecular techniques University College of London)

Στην παρασιτολογία, η επιλογή της περιοχής στόχου (αλληλουχίας) για ενίσχυση με PCR εξαρτάται από το σκοπό που θα εξυπηρετήσει η αντίδραση και το λόγο που στρεφόμεστε στη χρήση της. Όλες οι περιοχές του μιτοχονδιακού και πυρηνικού γενώματος των παρασίτων συσσωρεύουν μεταλλάξεις με την πάροδο του χρόνου ενώ μερικές είναι πιο επιρρεπείς σ' αυτές απ' ότι άλλες. Για παράδειγμα, μη κωδικοποιούσες περιοχές και ιντρόνια συνήθως εξελίσσονται ταχύτερα από τις κωδικοποιούσες περιοχές καθώς είναι δύσκολο να παρεμποδιστούν από τη λειτουργία τους, ενώ γονίδια που συνδέονται με συγκεκριμένη λειτουργία(ες) είναι λιγότερο πιθανό να συσσωρεύσουν αυθόρμητες μεταλλάξεις καθώς η λειτουργία αυτή είναι πιθανό να σχετίζεται με την επιβίωση του οργανισμού. Γενικά, αν η περιοχή στόχος θα έπρεπε να παρέχει γενετικούς δείκτες για την ταυτοποίηση ειδών παρασίτων, τότε το επίπεδο της διαφοροποίησης της αλληλουχίας εντός του είδους θα έπρεπε να είναι σημαντικά μικρότερο απ' αυτό μεταξύ των ειδών. Αν η περιοχή θα έπρεπε να παρέχει δείκτες για την ταυτοποίηση γενών, τότε εντός των υπό εξέταση ειδών θα έπρεπε να υπάρχει σημαντικό επίπεδο διαφοροποίησης αλληλουχίας (Gasser, 1999).

Το πυρηνικό DNA που κωδικοποιεί για τις ριβοσωμικές υπομονάδες (rDNA) αποτελεί χρήσιμη περιοχή στόχο για τον καθορισμό δεικτών για την ταυτοποίηση ειδών και / ή γενών.

Για τον καθορισμό μιας δοκιμασίας PCR, οι κατάλληλες αλληλουχίες στόχοι μπορούν να επιλεγούν με βάση προηγούμενα δεδομένα μελέτης παρόμοιων οργανισμών που είχαν τον ίδιο ερευνητικό στόχο. Εφόσον δεν υπάρχουν προηγούμενα δεδομένα αλληλουχιών DNA, τότε σχεδιάζονται ολιγονουκλεοτιδική εκκινητές στα 5' και 3' συμπληρωματικά άκρα του κλώνου DNA της ίδιας περιοχής του υπό μελέτη παρασίτου. Στη συνέχεια, προκαταρκτική πραγματοποίηση PCR μπορεί να καθορίσει εάν η περιοχή είναι δυνατόν να ενισχυθεί καταλλήλως και αλληλούχιση του DNA ή υβριδισμός επιβεβαιώνει την πιστότητα του ενισχυμένου τμήματος. Οι συνθήκες της αντίδρασης τροποποιούνται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη ακρίβεια, αξιοπιστία και αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Η ανίχνευση των προϊόντων της PCR βασίζεται συνήθως στο διαχωρισμό βάση μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης ή πολυακρυλαμίδιου.



### 1.2.3 PCR – Restriction Fragment Length Polymorphism

Όλες οι αναλύσεις RFLP περιλαμβάνουν πέψη (restriction-περιορισμό) του DNA με μία ή περισσότερες ενδονουκλεάσες, διαχωρίζοντας τα τμήματα που προκύπτουν με ηλεκτροφόρηση σε gel, βάσει μοριακού μεγέθους. Η παρατήρηση των gel επιδεικνύει τα προφίλ πέψης του DNA κάθε ατόμου που εξετάζεται και τα οποία μπορούν να προκύψουν από αντικατάσταση βάσεων εντός της περιοχής που αναγνωρίζεται από το ένζυμο πέψης, προσθήκη ή απώλεια βάσης, ανακατατάξεις αλληλουχίας, προκαλώντας χαρακτηριστικές αλλαγές στις μπάντες της ηλεκτροφόρησης σε κάθε περίπτωση. Τρεις σημαντικές και μερικώς σχετιζόμενες παράμετροι της δοκιμασίας είναι το μέσο της ηλεκτροφόρησης, οι τρόποι παρατήρησης των θραυσμάτων και η επιλογή του DNA προς ανάλυση (Avise, 1994).

Τα συνήθη μέσα ηλεκτροφόρησης είναι τα gel αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου. Η δομή που αποκτούν τα gel αυτά, επιτρέπει στα μικρότερα κομμάτια DNA να κινούνται με μεγαλύτερη ταχύτητα των μεγαλύτερων εντός τους, υπό την εφαρμογή σ' αυτά ηλεκτρικού πεδίου. Σε ουδέτερο pH, το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο (εξ' αιτίας ιδιοτήτων των ομάδων σακχάρων-φωσφόρου στην εξωτερική πλευρά του κλώνου), για το λόγο αυτό κινείται προς την άνοδο των gel ηλεκτροφόρησης, σε ρυθμούς που αναλογούν στο μοριακό του μέγεθος. Τα gel αγαρόζης (0,6-2,0% αγαρόζη) είναι πιο χρήσιμα στο διαχωρισμό θραυσμάτων DNA μεγέθους 300-20.000bp ενώ εκείνα του ακρυλαμιδίου (3,5-20,0% ακρυλαμίδιο) χρησιμοποιούνται για μεγέθη 10-1000bp. Για τη διευκόλυνση της εκτίμησης του μεγέθους των θραυσμάτων DNA που προκύπτουν υπάρχουν δείκτες (εμπορικά διαθέσιμοι) που τοποθετούνται σε κάθε gel ως κλίμακα μεγέθους.

Η παρατήρηση των θραυσμάτων DNA μπορεί να επιτευχθεί με διάφορα μέσα. Κάποιες ηλεκτροφορητικές διεργασίες ξεκινούν με DNA υψηλής καθαρότητας, απομονωμένο από ειδικές πηγές (όπως μιτοχόνδρια). Στην περίπτωση αυτή, χημικά η με χρήση ραδιενέργειας, αποκαλύπτονται στο gel τα αποτυπώματα του DNA. Όταν οι ποσότητες είναι αρκετά μεγάλες (>50ng ανα μπάντα του gel) το βρωμιούχο αιθίδιο αποτελεί έναν αξιόπιστο χημικό παράγοντα για την ανίχνευση των θραυσμάτων. Το μόριο αυτό προσδένεται στο DNA κατά τέτοιο τρόπο ώστε η ένταση των αποτυπωμάτων να είναι ανάλογη και με το μέγεθος του θραύσματος. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρουσιάζει και η τεχνική της DNA φluor στην οποία ένα μόριο μεγάλου μοριακού βάρους προσδένεται στο DNA κάνοντάς το να φθορίζει. Πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής αποτελούν η έλλειψη τοξικότητας και η μεγαλύτερη συγγένεια προς το DNA σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο. Σε διαδικασίες υψηλής ευαισθησίας όπου έχουμε σήμανση των άκρων του μορίου, τα θραύσματα του DNA σημαίνονται με <sup>32</sup>P- ή <sup>35</sup>S- ραδιενεργά νουκλεοτίδια πριν το διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση. Με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, το gel ξηραίνεται και επικαλύπτεται με X-ray φιλμ του οποίου η ανάπτυξη σαν αυτοραδιογράφημα αποκαλύπτει τις θέσεις στις οποίες βρίσκονται τα θραύσματα του DNA. Με την τεχνική σήμανσης των άκρων, η ένταση της μπάντας είναι ανεξάρτητη του μεγέθους του τμήματος DNA, κάτι που καθιστά τη μέθοδο χρήσιμη στην αποκάλυψη μικρότερων θραυσμάτων όταν τα ποσά του DNA είναι περιορισμένα.

Η PCR-RFLP έχει χρησιμοποιηθεί με αποτελεσματικότητα για τον καθορισμό γενετικών δεικτών ειδικών για είδη και γένη. Οι Bowles και McManus (1993a σε Gasser, 1999) καθόρισαν μία προσέγγιση για την άμεση αναγνώριση ειδών *Echinococcus*. Σε διάφορα δείγματα έγινε PCR στην ITS-1 του rDNA ενώ στη

συνέχεια στα προϊόντα έγινε πέψη με έναν αριθμό ενζύμων περιορισμού. Με τον τρόπο αυτό είχαμε το σχηματισμό χαρακτηριστικών προτύπων για τα είδη, μετά την ανάλυση διαφόρων δειγμάτων από μεγάλο αριθμό ειδών και γενών. Η μέθοδος αυτή επομένως παρείχε έναν απλό, υψηλά ευαίσθητο και άμεσο τρόπο για το διαχωρισμό δειγμάτων *Echinococcus* και για τη μελέτη άλλων ομάδων παρασίτων. Σε μία άλλη μελέτη (Gasser *et al.*, 1996c σε Gasser, 1999) αποδείχθηκε η εφαρμογή της τεχνικής στον καθορισμό ειδών νηματώδους. Η περιοχή του rDNA, (ITS-1, 5,8S γονίδιο, ITS-2) ενισχύθηκε με PCR από δείγματα γενωμικού DNA τα οποία αντιπροσώπευαν 16 διαφορετικά είδη σκουληκιών, ενώ στα προϊόντα έγινε ξεχωριστά πέψη με έξι περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η ανάλυσή τους έδωσε χαρακτηριστικά προφίλ για μεμονωμένα είδη, ενώ μεταξύ των ειδών *Cyathostomum catinatum* δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μετά από ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων. Επομένως, ο καθορισμός ειδικών για το είδος μοριακών δεικτών μέσω της τεχνικής αυτής είναι δυνατός και βρίσκει σημαντική εφαρμογή στη μελέτη της συστηματικής τέτοιων παρασίτων (Gasser, 1999).

### 1.3 Σκοπός της εργασίας

Στόχος της παρούσης μελέτης ήταν η ταυτοποίηση ειδών της οικογένειας Anisakidae, που συλλέχθηκαν από ξενιστές των ειδών *Stenella attenuata* (pantropical spotted dolphin), *Lagenodelphis hosei* (Fraser's dolphin) και *Kogia breviceps* (pygmy sperm whale) στην περιοχή του κόλπου του Μεξικού. Η ταυτοποίηση έγινε πρωτίστως με τη χρήση μεθόδων μοριακού χαρακτηρισμού, όπως PCR-RFLP ανάλυση, αλληλούχιση τμημάτων παρασιτικού DNA οι οποίες σε περιπτώσεις συνδυάστηκαν με την παρατήρηση μορφολογικών χαρακτήρων. Η εύρεση νέων περιοχών γεωγραφικής κατανομής ειδών των παρασίτων, η εύρεση πιθανών νέων ξενιστών τους σε συνδυασμό με την ανάλυση της γενετικής τους δομής είναι σε θέση να δώσουν πληροφορίες σε σχέση με την εξελικτική πορεία των ειδών αυτών, την ταξονομική τους θέση, την οικολογική τους συμπεριφορά και την επιδημιολογία τους. Αντικείμενο μελέτης σε σχέση με τα θαλάσσια θηλαστικά στα οποία παρασιτούν οι νηματώδεις αυτοί μπορεί να αποτελέσει η χρησιμοποίησή τους σαν βιολογικούς στόχους για τη διάκριση πληθυσμών αυτών.



## 2- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Υλικά παρασίτων, μικροσκοπική παρατήρηση δειγμάτων

Ενήλικα άτομα παρασιτικών νηματώδων συλλέχθηκαν από κητοειδή του κόλπου του Μεξικού και διατηρήθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  καθώς και σε 70% αιθανόλη.

Η μορφολογική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μικροσκοπίου φωτεινού πεδίου μεγέθυνσης 35 έως 1000 X.

Για πολλά από τα άτομα του συνόλου έγινε παρατήρηση των χαρακτήρων με διαγνωστική αξία (Fagerholm, 1989; Paggi et al., 2000) ενώ σχεδιάστηκαν κάποια αντιπροσωπευτικά δείγματα ειδών η ταυτοποίηση των οποίων ήταν δυνατή από τη μορφολογική και μόνο παρατήρηση.

### 2.2 Απομόνωση γενωμικού DNA και ενζυμική ενίσχυση περιοχών rDNA

Το γενωμικό DNA απομονώθηκε από κάθε άτομο χρησιμοποιώντας το Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) –βλέπε Παράρτημα- και διαλυτοποιήθηκε σε 100μL DNA Rehydration Solution (Promega). Περιοχές του rDNA ενισχύθηκαν με αντιδράσεις PCR σε κάθε άτομο που εξετάστηκε. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (50μL) πραγματοποιήθηκαν σε 100mM Tris-HCl (pH 8.3); 500mM KCl (10μL, 10x Buffer II, Perkin Elmer); 2,5mM MgCl<sub>2</sub>; 250μM κάθε dNTP; 100pM κάθε εκκινητή (NC2 (forward): GTCGAATTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA, NC5 (reverse): GCCGGATCCGAATCCTGGTTAGTTTCTTTTCCT, Life Technologies) και 2,5U *AmpiTaq Gold* πολυμεράσης (Perkin Elmer). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μηχανήμα εναλλαγής θερμοκρασίας Perkin Elmer – Gene Amp PCR System 2400 υπό τις παρακάτω συνθήκες: 10min στους 95°C, 35 κύκλοι των 30sec στους 95°C ( αποδιάταξη του DNA) 40sec στους 52°C (επαναδιάταξη των κλώνων) και 75sec στους 72°C(πολυμερισμός του DNA), ακολουθούμενοι από ένα τελικό διάστημα επιμήκυνσης 7min στους 72°C. 5μL γενωμικού DNA (5-10ng) προστέθηκαν σε κάθε αντίδραση. Σε κάθε σειρά αντιδράσεων συμπεριελήφθησαν δείγματα χωρίς DNA (negative controls) καθώς και δείγματα με DNA νηματώδους ήδη ελεγμένου για ενίσχυση της περιοχής του rDNA (positive controls). Τα προϊόντα της PCR ανιχνεύθηκαν σε gel αγαρόζης 1%-TBE 0.5x. Για την παρατήρηση των προϊόντων τα δείγματα επώαστηκαν με τη DNA fluor®, BioMedic (βλέπε Παράρτημα). Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα 110V για διάστημα 20 περίπου λεπτών και με συσκευή ESP 200-Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply. Μετά την έκθεση σε συσκευή υπεριώδους του gel, για την παρατήρηση του DNA και την αποθήκευση των εικόνων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MULTI-ANALYST (version 1.1-BIORAD).

### 2.3 PCR-RFLP

Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR, (10μL) υπέστησαν άμεση πέψη με 5U (0,5μL) από τις ενδονουκλεάσες *HinfI*, *HhaI* και *TaqI* (Promega), σε τελικό όγκο 15μL (1,5μL buffer E, C Promega, 0,2μL BSA-βλέπε Παράρτημα) στους 37°C για 1h με τις *HinfI* και *HhaI* και στους 65°C για 1h με την *TaqI*. Τα θραύσματα του DNA διαχωρίστηκαν σε gel 2% αραρόζης-TBE 0,5x, που περιείχε 0,75ng βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/mL). (Αποφεύγεται η χρήση της DNA fluor®, καθώς το μεγάλο MB της ουσίας η οποία προσδένεται στο DNA ενδεχομένως επηρεάσει την κινητικότητα των θραυσμάτων στο gel). Το μέγεθος του κάθε θραύσματος προσδιορίστηκε με τη χρήση μοριακού δείκτη Promega, 1000-750-500-300-100-50bp. Η ανάλυση των τμημάτων DNA που προέκυψαν έγινε μετά την έκθεση σε υπεριώδες ενώ οι εικόνες πάρθηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος MULTI-ANALYST (version 1.1-BIORAD). Τα πρότυπα που λήφθηκαν από τη συγκεκριμένη μελέτη συγκρίθηκαν μ' εκείνα που λήφθηκαν σε D' Amelio *et al.*, 2000.

### 2.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR αλληλούχιση περιοχών rDNA

Τα προϊόντα της PCR ετοιμάστηκαν για την αλληλούχιση μετά τον καθαρισμό με τη βοήθεια του πακέτου αντιδραστηρίων Nucleo-spin extract 2 in 1 της MACHEREY-NAGEL. (βλέπε Παράρτημα). 30μL καθαρού προϊόντος εστάλησαν στην MWG-BIOTECH, αλληλουχήθηκαν από την εταιρεία και ευθυγραμμίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος Crustal W. (1.8) Multiple Sequence Alignments. Η φυλογενετική ανάλυση της ITS περιοχής για τον προσδιορισμό γενετικών αποστάσεων και την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων με τη μέθοδο UPGMA(Unweighted Pair Groups Methods using Averages) και Neighbor Joining πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MEGA 2.1 (Kumar *et al*, 2001).

## 3- ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

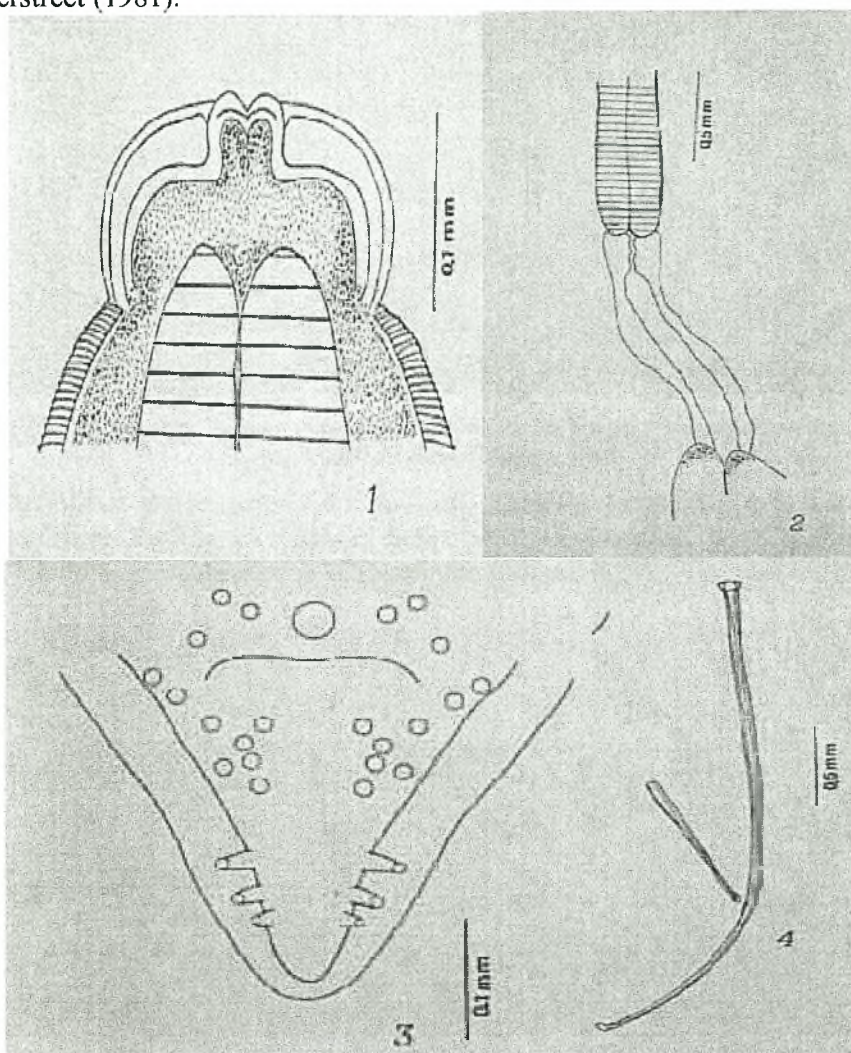
### 3.1 Μικροσκοπική παρατήρηση των προς ανάλυση δειγμάτων

Από τη μικροσκοπική παρατήρηση των δειγμάτων ευκρινέστερα δεδομένα υπάρχουν για τα είδη *A.tyrica*, η διάκριση των οποίων καθίσταται άμεσα και ευκολότερα δυνατή με την παρατήρηση των γεννητικών ακάνθων των αρσενικών ατόμων οι οποίες παρουσιάζουν χαρακτηριστική 1:3 αναλογία.

Ένα από τα άτομα *A.tyrica* που αναγνωρίστηκαν ήταν το SA4 για το οποίο πλήρης εικόνα παρατίθεται (Εικόνα 9).

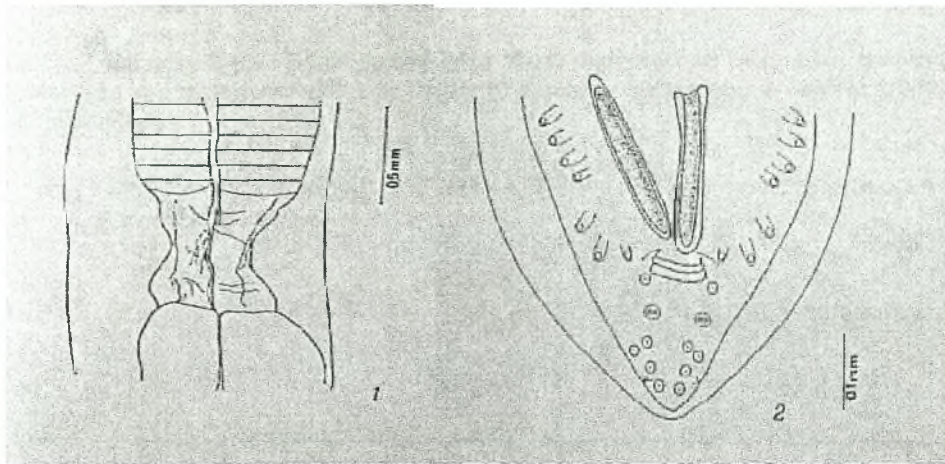
Τα δείγματα KB6, KB9, KB11 χαρακτηρίστηκαν ως μέλη του είδους *Anisakis brevispiculata* (άκανθοι ίσου σχεδόν μεγέθους ~0,2mm, στομάχι κοντό και πλατύ μήκους ~0,5mm)(Εικόνα 10) ενώ το δείγμα KB7 φαίνεται να ανήκει στο είδος *Pseudoterranova ceticola* (χαρακτηριστική παράλληλη στο στομάχι προέκταση στο άνω πεπτικό, ουρά σχετικά μεγάλη κωνική και κυρτή στο τελικό τμήμα της)

συγκρίνοντας τα χαρακτηριστικά του με αυτά που περιγράφηκαν από τους Deardorff και Overstreet (1981).



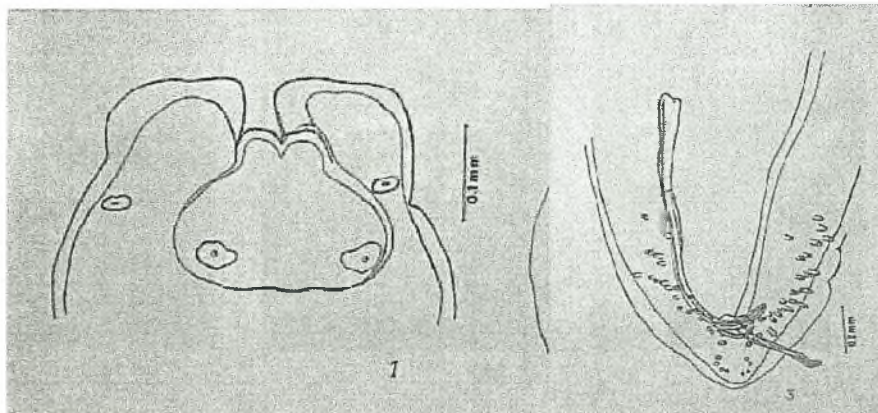
Εικόνα 9. - 1) Άκρη κεφαλιού 2) Στομάχι 3) Ακραίο τμήμα ουράς αρσενικού 4) Γεννητικές άκανθοι. Δείγμα SA4.





Εικόνα 10. - 1) Στομάχι 2) Ακρη ουράς αρσενικού (χαρακτηριστικές όμοιου μεγέθους κοντές γεννητικές άκανθοι). Δείγμα KB6

Δεδομένα για το άτομο LH4 το οποίο χαρακτηρίστηκε ως *Anisakis pegreffii* φαίνονται στην Εικόνα 11 (Λόγος αριστερή:δεξιά άκανθος, 1: 1,41, οισοφάγος μήκους 3,80mm, στομάχι μήκους 0,91mm και πλάτους 0,25).

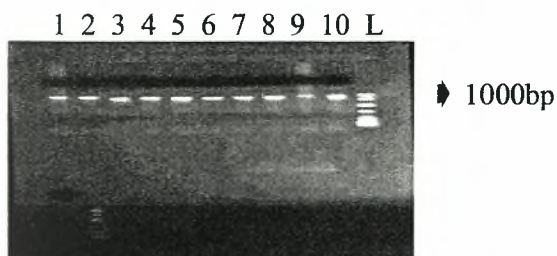


Εικόνα 11. - 1) Χείλη, άκρη κεφαλιού 3) Ακραία περιοχή ουράς αρσενικού. Δείγμα LH4

### 3.2 Ενίσχυση με PCR

Η απομόνωση DNA και η ενίσχυση περιοχών του παρασιτικού γενώματος πραγματοποιήθηκε σε 32 άτομα ενήλικες.

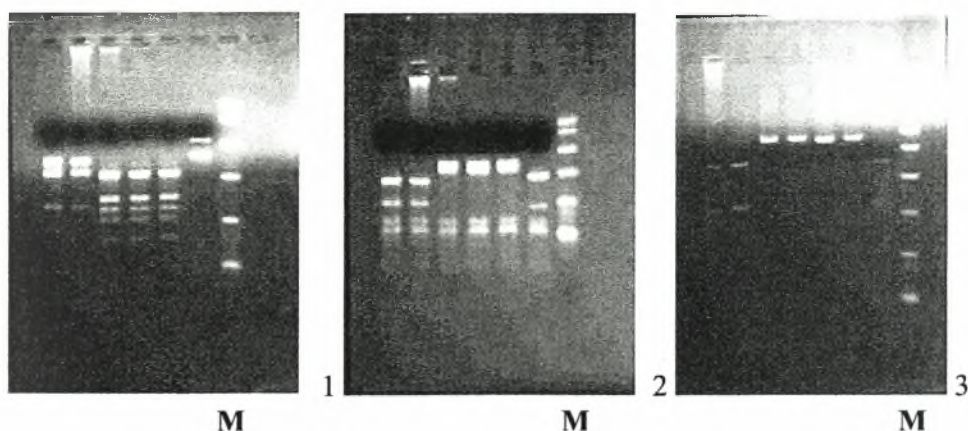
Το τμήμα που ενισχύθηκε από τους εκκινητές NC2 και NC5 ήταν ορατό σε gel αγαρόζης όπως αυτό που φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 12)



Εικόνα 12. – Gel αγαρόζης (1%) με χρώση DNA fluor. Φαίνονται τα ενισχυμένα τμήματα του rDNA από είδη του γένους *Anisakis* 1-9; Στήλη 10 θετικός μάρτυρας και L-δείκτης (1000, 750, 500, 350, 100, 50bp)

Η ενίσχυση της περιοχής του rDNA (ITS-1, ITS-2 και 5,8S υπομονάδα) έδωσε τμήμα μεγέθους ~1Kbp

### 3.3 PCR-RFLP ανάλυση των δειγμάτων



Εικόνα 13 – Πρότυπα ανάλυσης μεγέθους πολυμορφικών τμημάτων της περιοχής ITS-1, 5,8S και ITS-2. Σε gel αγαρόζης 2%, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο  
1. πέψη με HhaI, 2. πέψη με TaqI, 3. Πέψη με HinfI.  
M-δείκτης 1000-750-500-300-100-50bp.

Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει τα μεγέθη σε bp των τμημάτων που παρατηρήθηκαν μετά την πέψη με ένζυμα περιορισμού σε 24 δείγματα.

Η ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων αποκαλύπτει ότι:

Κοινά πρότυπα παρουσιάζουν τα: DP1, DP2, KB11, KB6, KB22, DP5 τα οποία μετά από πέψη με TaqI δίνουν μπάντες στα 300, 280, 100 και διπλή κάτω των 100bp, μετά από πέψη με HhaI στα 420, 370 και 150 bp ενώ για το HinfI δεν φαίνεται να έχουμε τομή του DNA. -για τα δείγματα DP1 και DP2 δεν υπάρχουν στοιχεία πέψης με HinfI κατά πάσα πιθανότητα όμως τοποθετούνται ανεξαρτήτως στην ομάδα αυτή. Για την ομάδα αυτή δεν έχουμε προηγούμενα πρότυπα κατάταξης, ως εκ τούτου η RFLP ανάλυση ταυτοποιεί μόνο την μεταξύ των ατόμων αυτών ομοιότητα.

Τα LH7, LH9, LH16, SA1, SA3, SA4, SA5, LH6, LH18, δίνουν μπάντες στα 400, 350, 70 και 60bp μετά από πέψη με TaqI, στα 340, 320, 180 και 160bp μετά από

πέψη με HhaI και στα 620 και 350bp μετά από πέψη με HinfI. Τα πρότυπα αυτά είναι χαρακτηριστικά του *Anisakis typica* (D' Amelio *et al.*, 2000).

Για το άτομο KB10 παρατηρούμε πρότυπα ικανά για χαρακτηρισμό ως *Anisakis physeteris*, συγκρινόμενα με τα πρότυπα από D' Amelio *et al.*, 2000, με την πέψη με TaqI να δίνει μπάντες στα 300,280,140bp, με HhaI 530,420bp και με HinfI 380,290,270bp.

Για το άτομο LH4 παρατηρούμε μπάντες των 550 και 430 περίπου bp μετά την πέψη με HhaI και μπάντες των 370,300,250bp μετά την πέψη με HinfI. Συγκρίνοντας με πρότυπα από D' Amelio *et al.*,2000 το άτομο αυτό ταυτοποιείται ως *Anisakis pegreffii*.

Μία ακόμη ομάδα ατόμων θα μπορούσαν να αποτελέσουν τα KB1,KB21 και KB00 με κοινές μπάντες πέψης με το HhaI στις 520,450bp ελλειπή όμως στοιχεία αναφορικά με την πέψη με TaqI και τα δύο τελευταία χωρίς σημεία τομής από το HinfI. Για τα άτομα αυτά επίσης δεν υπάρχουν πρότυπα αναφοράς.

Και για τα άτομα KB7,KB16,KB23 μπορούμε να ισχυριστούμε πως προέρχονται κατά πάσα πιθανότητα από το ίδιο είδος χωρίς όμως να έχουμε προηγούμενα πρότυπα σύγκρισης και ταυτοποίησης για 400,200 και 150bp με πέψη HhaI και κανένα σημείο τομής με HinfI.

Για το άτομο KB9 υπάρχουν σαφή στοιχεία μόνο για την πέψη με HhaI με την οποία δίνει μπάντες στα 500 και 420bp, χωρίς όμως να μπορούμε να ισχυριστούμε ότι το πρότυπο αυτό μπορεί να ταυτιστεί με κάποιο ήδη αναγνωρισμένο.

Κωδικός δείγματος	TaqI	HhaI	HinfI
DP1	300-280-100-70-60	420-370-150	
DP2	300-280-100-70-60	420-370-150	
LH7	400-350-70-60	340-320-180-160	
LH9	400-350-70-60	340-320-180-160	
LH16	400-350-70-60	340-320-180-160	
KB1	340-300-90-70-60	520-450	
KB10	300-280-140	530-420	380-290-270
SA1	400-350-70-60	340-320-180-160	620-350
KB9	300	500-420	-
KB11	300-280-100-70-60	420-370-150	-
KB7	450	400-200-150	-
KB6	300-280-100-70-60	420-370-150	-
SA4		340-320-180-160	620-350
SA3		340-320-180-160	620-350
KB16		400-200-150	-
KB21		520-450	-
KB22		420-370-150	-
KB23		400-200-150	-
SA5		340-320-180-160	620-350
LH4		550-430	370-300-250
LH6		340-320-180-160	620-350
KB00		520-450	-



DP5		420-370-150	-
LH18		340-320-180-160	620-350

Πίνακας-1

### 3.4 Ανάλυση αλληλουχιών

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων που λήφθηκαν (από MWG Biotech) από την ενίσχυση της περιοχής του rDNA (ITS-1, ITS-2 και 5,8S υπομονάδα) ευθυγραμμίστηκαν με τον τρόπο που φαίνεται στη συνέχεια με τη βοήθεια του προγράμματος Crystal W (1.8) Multiple Sequence Alignments. Ο σκοπός της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών είναι η τοποθέτηση των ομόλογων νουκλεοτιδίων στην ίδια στήλη ώστε να καθίσταται δυνατή η άμεση σύγκριση των διαφορετικών αλληλουχιών. Η ανάλυση των αλληλουχιών της συγκεκριμένης περιοχής έγινε σε 19 άτομα παρασίτων.







```

vas.irelexc      ATTGCCTAT  CCGCTTCATT  CCGCATGGCA  CCTCTGGTC  ABBCTCGAAT  TACGGTGAAC  600
vas.irelexs.s.  .....
vas.iregtrfiii  .....
vas.iresteris   .....
vas.irethiduran .....
vas.irevicia    .....
vas.irevixis.sp.#from_madeira .....
vRF3            .....
vI-9            .....
vI-13           .....
vEX8            .....
vI-6            .....
vEX20           .....
vRF5            .....
vI-18           .....
vEX13           .....
vSA1            .....
vEX11           .....
vEX2            .....
vSA4            .....
vEX12           .....
vEX21           .....
vEX22           .....
vEX23           .....
vSA5            .....

```

```

vas.irelexc      TGTCTTACC  GTCTTTC---  -----TCC  ACTCTGAAGC  ATTCCCAAG  CAATTCTCT  660
vas.irelexs.s.  .....
vas.iregtrfiii  .....
vas.iresteris   .A.....CT.  CTCC-----  C.C.....A.  .....T...  660
vas.irethiduran .CA.....TC.A  A..AC..TTC  TCAGATTGT.  .T.....G...  .C...T...  660
vas.irevicia    .A.....C.A  C..TC..A---  -----GT.  .G.....G...  .....T...  660
vas.irevixis.sp.#from_madeira .A.....G...  .T.C-----  -----C...  .....T...  660
vRF3            .....
vI-9            .CA.....TC.A  A..AC..TTC  TCAGATTGT.  .T.....G...  .C...T...  660
vI-13           .A.....CAA  .T.C-----  -----G...  .....T...  660
vEX8            .CA.....TC.A  A..AC..TTC  TCAGATTGT.  .T.....G...  .C...T...  660
vEX20           .A.....G...  .T.C-----  -----C...  .....T...  660
vRF5            .A.....G...  .T.C-----  -----C...  .....T...  660
vI-18           .CA.....TC.A  A..AC..TTC  TCAGATTGT.  .T.....G...  .C...T...  660
vEX13           .A.....GT.  CTCC-----  -----G.C...  .....T...  660
vSA1            .CA.....TC.A  A..AC..TTC  TCAGATTGT.  .T.....G...  .C...T...  660
vEX11           .A.....G...  .T.C-----  -----G...  .....T...  660
vEX2            .A.....CAA  .T.C-----  -----T.C...  .....T...  660
vEX6            .A.....G...  .T.C-----  -----G...  .....T...  660
vSA4            .....
vEX16           .A.....CAA  .T.C-----  -----T.C...  .....T...  660
vEX21           .A.....C.A  .T.C-----  -----G...  .....T...  660
vEX22           .A.....G...  .T.C-----  -----G...  .....T...  660
vEX23           .A.....CAA  .T.C-----  -----T.C...  .....T...  660
vSA5            .CA.....TC.A  A..AC..TTC  TCAGATTGT.  .T.....G...  .C...T...  660

```

```

vas.irelexc      TGTCTT-CTT  CCGTATTCTA  TCATCCACAA  TATGACGGCC  GOTTCTCTCC  TTAGTGTCA  720
vas.irelexs.s.  .....
vas.iregtrfiii  .....
vas.iresteris   C.....T...  .TCC..GG  ---TTTC.  ATC.GT---  .A..GGCC.  .CGAC..GTC  720
vas.irethiduran .....
vas.irevicia    .....
vas.irevixis.sp.#from_madeira .....
vRF3            .....
vI-9            .....
vI-13           C.....T...  .C.T..ACC.G  A..--ATTG.  ATC.G.A--  C.CC.GACA.  CACAC..G.TC  720
vEX8            .....
vI-6            C.....T...  .C.T..ACC.G  A..--ATTG.  ATC.G.A--  C.CC.GACA.  CACAC..G.TC  720
vEX20           .....
vRF5            .....
vI-18           C.....T...  .C.T..ACC.G  A..--ATTG.  ATC.G.A--  C.CC.GACA.  CACAC..G.TC  720
vEX13           C.....T...  .TCC..GG  ---TTTC.  ATC.GT---  .A..GGCC.  .CGAC..GTC  720
vSA1            .....
vEX11           C.....T...  .C.T..ACC.G  A..--ATTG.  ATC.G.A--  C.CC.GACA.  CACAC..G.TC  720
vEX2            .....
vSA4            .....
vEX16           .....
vEX21           .....
vEX22           .....
vEX23           .....
vSA5            C.....T...  .C.T..ACC.G  A..--ATTG.  ATC.G.A--  C.CC.GACA.  CACAC..G.TC  720

```

CA:imlenc	TAA-AAGAA	AGCCTAACAC	CGAATCTACT	ATAC TAC TAA	TACTACTATA	TAGG-TCAGC	
CA:imlenc.s.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:mgre <sup>4311</sup>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:myobacteris	CTTCTTT,GT	T...TGTGTG	A,G-----	----AGAGGT	C,AC,CCGA,	CG----AG..	
CA:imlencuram	AG,C.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:yojia	CTTCTTT,GT	TT,ATC,ACA	AA,,G---,G	TCC,CCAC,C	CCAA,,C,C,G	CTAAACAATA	
CA:isaxia_scl_from_madeira	C,CC.....	A,A,CT..A	T-----C	TC.....A,G	.....	.....	
CPD	CTTCTTT,GT	T...T-----	.....	.....	.....	.....	
CI-4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CI-13	CTTCTTT,GT	TT,ATC,ACA	AA,,G---,G	TCC,CCAC,C	CCAA,,C,C,G	CTAAACAATA	
CI-8	-GTG,...,G,	---TGTGTG	AA,C-----	C,CTAGAGGT	..AC,CCG..	CG,-C,G,T..	
CI-6	CTTCTTT,GT	TT,ATC,ACA	AA,,G---,G	TCC,CCAC,C	CCAA,,C,C,G	CTAAACAATA	
CI-20	CTTCTTT,GT	T...TGTGTG	AAG-----	----AGAGGT	..AC,CCGA,	CG----AG..	
CI-18	CTTCTTT,GT	T...TGTGTG	AAG-----	----AGAGGT	..AC,CCGA,	CG----AG..	
CI-16	CTTCTTT,GT	TT,ATC,ACA	AA,,G---,G	TCC,CCAC,C	CCAA,,C,C,G	CTAAACAATA	
CI-14	CTTCTTT,GT	TT,ATC,ACA	AA,,G---,G	TCC,CCAC,C	CCAA,,C,C,G	CTAAACAATA	
CI-11	CTTCTTT,GT	T...TGTGTG	AAG-----	----AGAGGT	..AC,CCGA,	CG----AG..	
CI-9	-GTG,...,G,	---TGTGTG	AA,C-----	C,CTAGAGGT	..AC,CCG..	CG,-C,G,T..	
CI-5	CTTCTTT,GT	T...TGTGTG	AAG-----	----AGAGGT	..AC,CCGA,	CG----AG..	
CI-3	-GTG,...,G,	---TGTGTG	AA,C-----	C,CTAGAGGT	..AC,CCG..	CG,-C,G,T..	
CI-2	CTTCTTT,GT	TT,ATC,ACA	AA,,G---,G	TCC,CCAC,C	CCAA,,C,C,G	CTAAACAATA	
CI-1	CTTCTTT,GT	TT,ATC,ACA	AA,,G---,G	TCC,CCAC,C	CCAA,,C,C,G	CTAAACAATA	
CA:imlenc	TCTTTTGTG	CGTCAAAAA	CTCACA--CT	ATGCCA TTG	ATAGGCCAA	CAACCAGAT	
CA:imlenc.s.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:mgre <sup>4311</sup>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:myobacteris	..A,A.....	A..G.....	..A..T...	.....	.....	.....	
CA:imlencuram	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:yojia	CA,AGAC,...	..CT,T,G,	CTGTTCG...	G,AT-...G	..G,TCA...	A,GTGCGCC	
CA:isaxia_scl_from_madeira	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CPD	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CI-4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CI-13	CA,AGAC,...	..CT,T,G,	CTGTTCG...	G,AT-...G	..G,TCA...	A,GTGCGCC	
CI-8	AAA.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CI-6	CA,AGAC,...	..CT,T---	.....	.....	.....	.....	
CI-20	..A,A.....	..G.....	..G..G..	.....	.....	.....	
CI-18	..A,A.....	..G..G..	..G..G..	.....	.....	.....	
CI-16	CA,AGAC,...	..CT,T,G,	CTGTTCG...	G,AT-...G	..G,TCA...	A,GTGCGCC	
CI-14	..A,A.....	..G.....	..G..G..	.....	.....	.....	
CI-11	CA,AGAC,...	..CT,T,G,	CTGTTCG...	G,AT-...G	..G,TCA...	A,GTGCGCC	
CI-9	..A,A.....	..G..G..	..G..G..	.....	.....	.....	
CI-7	..A,A.....	..G.....	.....	.....	.....	.....	
CI-5	..A,A.....	..G..G..	..G..G..	.....	.....	.....	
CI-3	..A,A.....	..G.....	.....	.....	.....	.....	
CI-2	..A,A.....	..G..G..	..G..G..	.....	.....	.....	
CI-1	CA,AGAC,...	..CT,T,G,	CTGTTCG...	G,AT-...G	..G,TCA...	A,GTGCGCC	
CA:imlenc	AGC-TCATAA	GTTCGTGTGT	TGATAAAGC	CGAAGCGAAT	CAAGCAGTGT	TATGTATCA	
CA:imlenc.s.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:mgre <sup>4311</sup>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:myobacteris	..TGT-----	..TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG.....	
CA:imlencuram	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CA:yojia	..TTTCATAGT	..CCAA,AAAC	A,CAT,CGTC	TATCATACTA	..TA...TT,G,	..GGT...G,	
CA:isaxia_scl_from_madeira	..G,A....	.....	.....	.....	..TAI...G	.....	
CPD	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CI-4	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CI-13	..TTTCATAGT	..CCAA,AAAC	A,CAT,CGTC	TATCATACTA	..TA...TT,G,	..GGT...G,	
CI-8	..ACA,CTT	CGGTTGCTTG	ATGAACTGGC	AACCGA,T,G	TCATCGATGT	G,CAACAAT	
CI-6	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CI-20	G,TCG...G,	CAA,TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG...TAAC	
CI-18	..TAT-----	..TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG...TAAC	
CI-16	..TTTCATAGT	..CCAA,AAAC	A,CAT,CGTC	TATCATACTA	..TA...TT,G,	..GGT...G,	
CI-14	..TAT-----	..TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG...TAAC	
CI-11	..TTTCATAGT	..CCAA,AAAC	A,CAT,CGTC	TATCATACTA	..TA...TT,G,	..GGT...G,	
CI-9	..TAT-----	..TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG...TAAC	
CI-7	..TAT-----	..TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG...TAAC	
CI-5	..TAT-----	..TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG...TAAC	
CI-3	..ACA,CTT	CGGTTGCTTG	ATGAACTGGC	AACCGA,T,G	TCATCGATGT	G,CAACAAT	
CI-2	G,TCG...G,	CAA,TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG...TAAC	
CI-1	..TAT-----	..TTG,C,	G,T...TGAA	CTGTT...CA	CGGA,TCAGC	CG...TAAC	
CA:imlenc	..TTTCATAGT	..CCAA,AAAC	A,CAT,CGTC	TATCATACTA	..TA...TT,G,	..GGT...G,	



vsiimplx0	AAATGATAC	TATTTGACCT	GAGCTGACTC	GTCATTAGCC	GCTGAAITTA	AGCATATAAT	960
vsiimplx0.s.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.ii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.iii	GG...T..TG	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.iiii	.....T..TA	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.v	..CGGC..ACC	G..A..GTG..GC	AT..ATGTCA	TC..CA..G..G	ATAATC..CC	TATT..GACC	960
vsiimplx0.vi	...A..T..TA	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.vii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.viii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.ix	..CGGC..ACC	G..A..GTG..GC	AT..ATGTCA	TC..CA..G..G	ATA-----	.....	960
vsiimplx0.x	GTTTCT..TT	G..C-----	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xi	.....	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xii	CGTC...CA	AGAAC-ETT	GTA..TGA..C	TCAGC..CACT	CG...T..ACC	.....	960
vsiimplx0.xiii	CG...T..TC	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xiv	..CGGC..ACC	G..A..GTG..GC	AT..ATGTCA	TC..CA..G..G	ATA-----	.....	960
vsiimplx0.xv	CG...T..TG	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xvi	..CGGC..ACC	G..A..GTG..GC	AT..ATGTCA	TC..CA..G..G	ATAATC..CC	TATT..GACC	960
vsiimplx0.xvii	..CG..ACC..TT	GTA..TGA..C	TCAGC-----	TC..CA..G..G	ATAATC..CC	TATT..GACC	960
vsiimplx0.xviii	TETT..TATT	CA-----	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xix	..CG..ACC..	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xx	.....	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xxi	.....	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xxii	CGTC...CA	AGAACCSTT	GTA..TGA..C	TCAGC-----	.....	.....	960
vsiimplx0.xxiii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0.xxiv	..CGGC..ACC	G..-----	.....	.....	.....	.....	960
vsiimplx0	TAACCGGAGC	AATAGAAACT	AACGACGATT	-----	-----	-----	1020
vsiimplx0.s.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.ii	.....	.....	.....ATGCA	ATT-----	-----	-----	1020
vsiimplx0.iii	.....	.....	.....	C-----	-----	-----	1020
vsiimplx0.iiii	.....	.....	.....	.....	-----	-----	1020
vsiimplx0.v	C..GCTCAGT	GTC..TT..G..C	GCTG..ATT..A	AGCATATAAT	TACCGGAGC	AAAGCAAACT	1020
vsiimplx0.vi	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.vii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.viii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.ix	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.x	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xi	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xiii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xiv	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xv	C..GCTCAGT-	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xvi	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xvii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xviii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xix	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xx	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xxi	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xxii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xxiii	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0.xxiv	.....	.....	.....	.....	.....	.....	1020
vsiimplx0	-----	T1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.s.	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.ii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.iii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.iiii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.v	AACGACGATT	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.vi	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.vii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.viii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.ix	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.x	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xi	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xiii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xiv	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xv	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xvi	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xvii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xviii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xix	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xx	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xxi	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xxii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xxiii	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030
vsiimplx0.xxiv	-----	1030	-----	-----	-----	-----	1030

Εικόνα 14 - Ευθυγράμμιση αλληλουχιών του rDNA (ITS-1, 5.8S, ITS-2) ατόμων του γένους Anisakis με 19 άγνωστα άτομα. Οι τελείες (.) υποδηλώνουν ομοιότητα αλληλουχίας μεταξύ των ατόμων ενώ οι παύλες (-) έλλειψη δεδομένων (Crystal W 1.8)

### 3.5 Γενετικές αποστάσεις ανάμεσα σε άτομα του γένους *Anisakis* και τα είδη προς ανάλυση

```
[ 1] #Asimplexc
[ 2] #Asimplexs.s.
[ 3] #Apegreffii
[ 4] #Aphyseteris
[ 5] #Aziphidarum
[ 6] #Atypica
[ 7] #Anisakis_sp_from_madeira
[ 8] #DP3
[ 9] #LH4
[10] #LH19
[11] #KBX
[12] #LH6
[13] #KB00
[14] #DP5
[15] #LH18
[16] #KB10
[17] #SA1
[18] #KB11
[19] #KB7
[20] #KB6
[21] #SA4
[22] #KB16
[23] #KB21
[24] #KB22
[25] #KB23
[26] #SA5
```

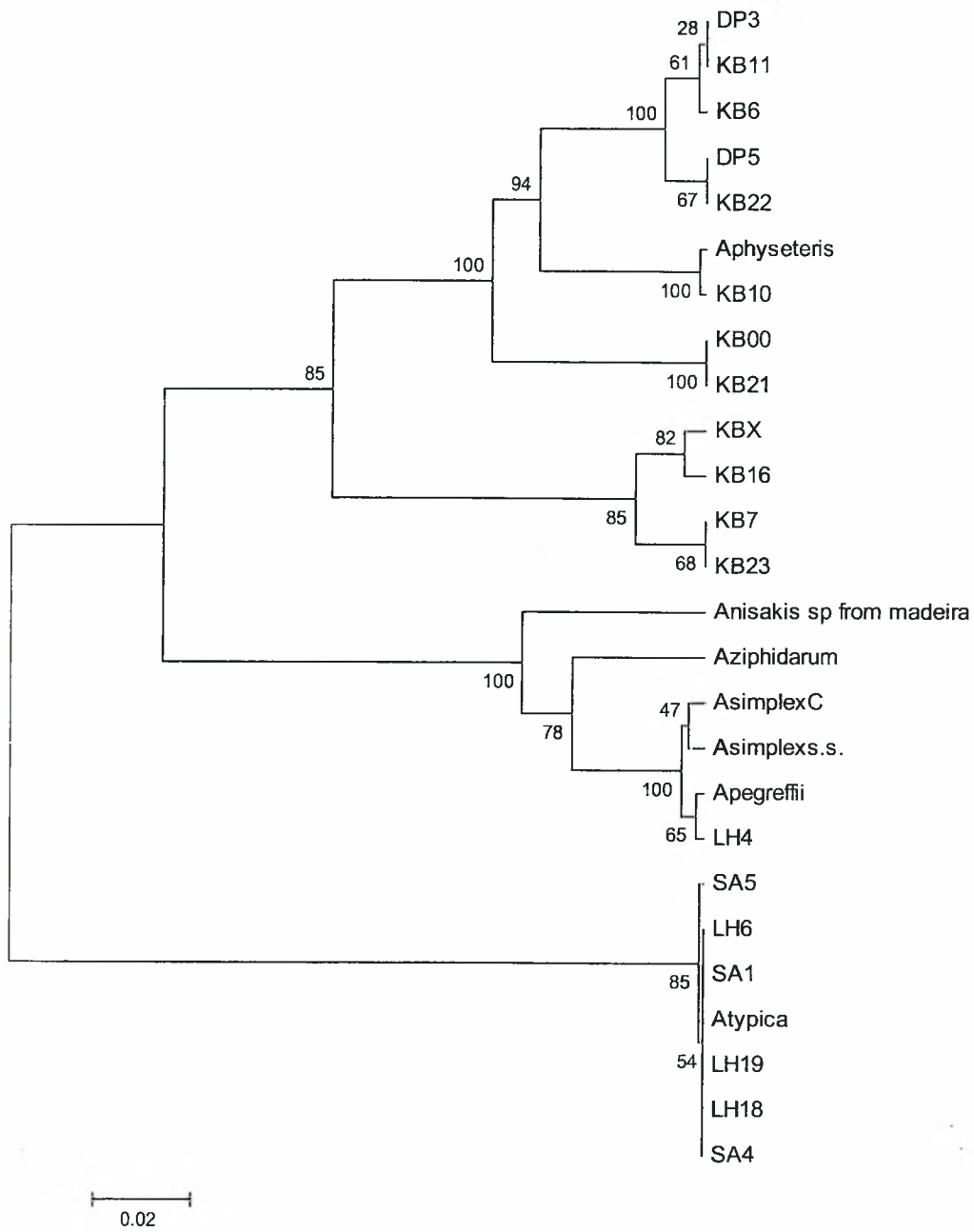
```
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 ]
[ 1]
[ 2] 6
[ 3] 11 11
[ 4] 189 189 193
[ 5] 45 47 51 179
[ 6] 282 285 286 277 266
[ 7] 66 67 66 160 50 246
[ 8] 87 87 88 30 84 85 93
[ 9] 4 4 2 85 33 99 38 80
[10] 245 247 248 208 229 0 228 85 99
[11] 167 167 169 133 153 204 163 62 70 204
[12] 147 149 150 115 132 0 126 85 99 0 130
[13] 186 186 185 89 180 216 185 31 70 210 121 107
[14] 153 153 154 36 142 210 153 0 79 209 114 115 77
[15] 245 247 248 208 229 0 228 85 99 0 204 0 210 209
[16] 157 157 156 2 146 186 155 28 82 186 124 112 60 34 186
[17] 266 268 269 230 250 0 245 85 99 0 204 0 215 210 0 186
[18] 177 176 178 82 170 197 181 0 81 194 120 118 81 40 194 68 194
[19] 157 157 159 114 141 188 148 55 65 188 40 119 101 102 188 112 188 109
[20] 168 167 169 65 163 192 167 0 81 183 118 118 66 28 183 63 184 5 107
[21] 41 42 42 41 31 0 41 41 42 0 38 0 39 39 0 40 0 41 39 41
[22] 145 145 147 111 131 183 140 56 64 183 6 121 102 100 183 109 183 100 26 100 37
[23] 195 195 193 80 189 222 177 31 70 203 121 107 0 72 203 61 203 82 101 66 39 102
[24] 136 136 137 37 133 164 140 0 80 164 89 117 39 0 164 35 164 3 80 3 41 83 39
[25] 57 57 58 43 54 88 51 28 23 88 5 80 31 33 88 41 88 33 0 33 0 1 31 33
[26] 220 222 223 184 205 1 203 83 97 1 195 1 185 186 1 182 1 184 186 181 1 183 185 162 88
```

**Πίνακας 2- Αποστάσεις ανάμεσα στα είδη του γένους *Anisakis* και τα άγνωστα άτομα. (Από MEGA 2.1) Αριθμός νουκλεοτιδίων 1030, κενά τμήματα και ελλιπείς πληροφορίες αφαιρέθηκαν στις συγκρίσεις ζευγών.**

Οι γενετικές αποστάσεις των αγνώστων ειδών σε σχέση με τα 7 γνωστά είδη *Anisakis* που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος MEGA 2.1 και αναγράφονται στον Πίνακα 2. Οι παράμετροι

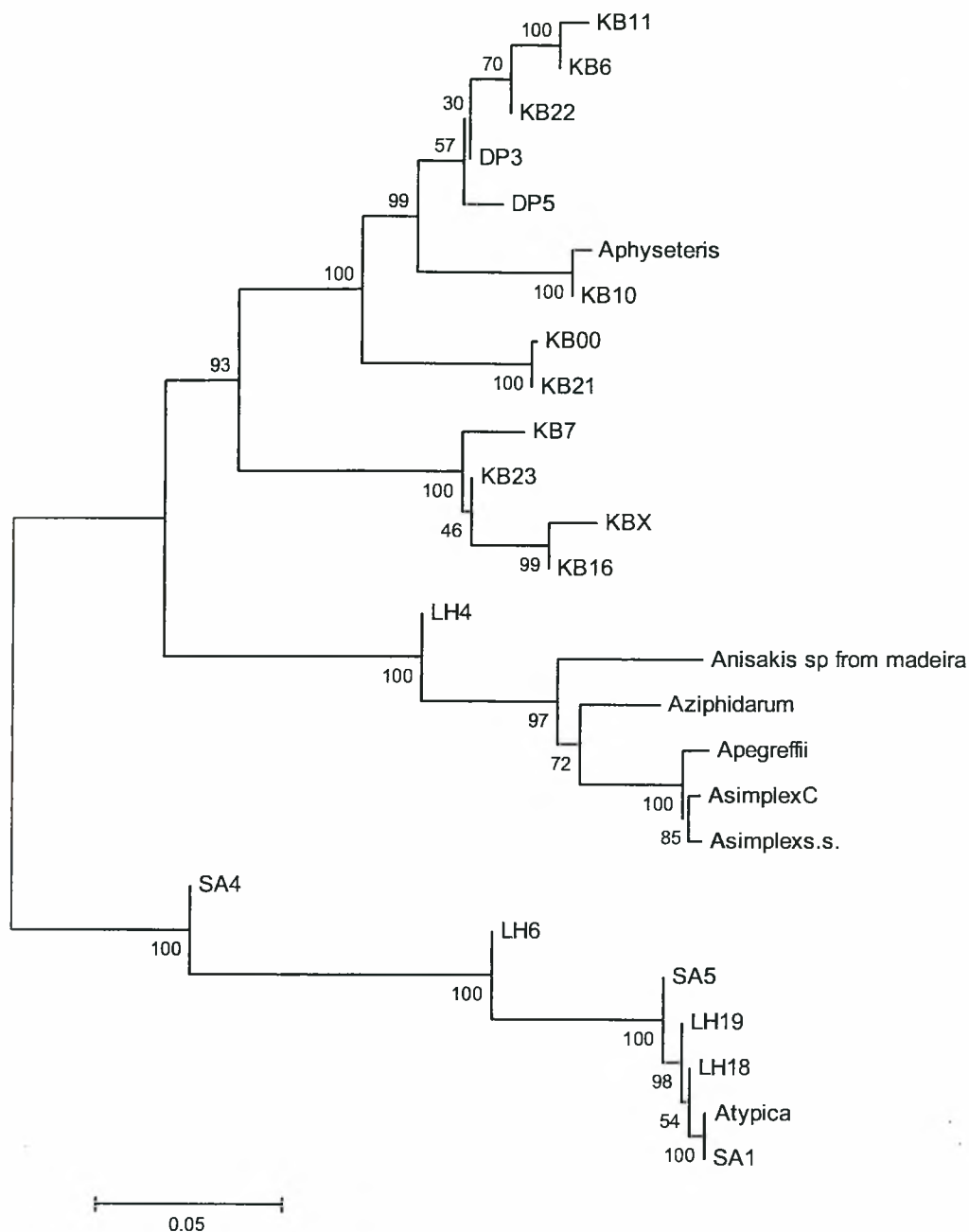
υπολογισμού των αποστάσεων που απαιτούνται από το πρόγραμμα και χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικά: Analysis: Pairwise Distance Calculation, Compute: Distances only, Gaps/Missing data: Pairwise deletion, Substitution model: Nucleotide – Number of differences, Substitutions included: Transitions and transversions, Homogenous pattern among lineages, Uniform rates among sites. Η εξελικτική απόσταση μεταξύ ενός ζεύγους αλληλουχιών, υπολογίζεται συνήθως με τον αριθμό των νουκλεοτιδικών αντικαταστάσεων μεταξύ τους. Οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των αποστάσεων επιλέχθηκαν με βάση τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της περιοχής που μελετήθηκε (χαμηλός ρυθμός εξέλιξης, σχετική ομοιογένεια μεταξύ διαφορετικών ειδών) καθώς και τη μέτριας ποιότητας αλληλουχία που είχαμε στη διάθεση μας, της οποίας τα κενά και τα ελλιπή δεδομένα ήταν πολλά και κατανεμημένα τυχαία κατά μήκος της με αποτέλεσμα να επιλεγεί η παράμετρος της Pairwise deletion αντί της Complete deletion των θέσεων αυτών.

Με τη βοήθεια και πάλι του προγράμματος MEGA 2.1 και χρησιμοποιώντας την παράμετρο Kimura-2 για τον υπολογισμό των αντικαταστάσεων με βάση το ρυθμό αντικατάστασης και όχι τον αριθμό τους στις αλληλουχίες που μελετώνται (λειτουργεί διορθωτικά στην τελική κατασκευή του δέντρου), κατασκευάστηκε ένα Neighbor Joining φυλογενετικό δένδρο (δεν θεωρεί σταθερό τον εξελικτικό ρυθμό των ειδών) για να δείξει τη θέση των αγνώστων ειδών σε σχέση με τα άλλα, καθώς και ένα UPGMA (ο εξελικτικός ρυθμός θεωρείται σταθερός) φυλογενετικό δένδρο με βάση τον αριθμό των διαφορών αλληλουχίας για τον ίδιο λόγο. Και στις δύο περιπτώσεις εφαρμόστηκε bootstrap test αξιοπιστίας της μεθόδου (Efron 1982, σε Felsenstein, 1985) Και οι δύο τύποι δένδρων κατατάσσουν τα άτομα που μελετούμε σε διακριτές ομάδες.



Εικόνα 15- UPGMA tree (MEGA 2.1)





Εικόνα 16- Neighbor Joining tree (MEGA 2.1)

Τα είδη *Anisakis simplex s.s.*, *Anisakis pegreffii* και *Anisakis simplex C*, αποτελούν μέλη του *Anisakis simplex* complex και χαρακτηρίζονται αδελφά. Το *Anisakis ziphidarum* αποτελεί είδος που περιγράφηκε σχετικά πρόσφατα (Paggi, 1998), ενώ το *Anisakis* sp from Madeira αποτελεί πιθανότατα νέο είδος συγγενικό με το προηγούμενο (Costa et al., ανέκδοτα δεδομένα σε προετοιμασία)

Από την παρατήρηση των φυλογενετικών δένδρων προκύπτουν 4 διακριτές ομάδες ατόμων καθώς και δύο άτομα τα οποία φαίνεται να ανήκουν στα είδη *Anisakis*

*physeteris* (KB10) και *Anisakis pegreffii* (LH4). Αναλυτικότερα, τα άτομα SA4, LH6, SA5, LH19, LH18 και SA1 φαίνεται να ταυτίζονται με το είδος του *Anisakis typica*. Σχετικά με τα άτομα KB11, KB6, KB22, DP3, DP5, παρατηρούμε πως το γενετικό τους πρότυπο βρίσκεται κοντά στο είδος του *Anisakis physeteris*, χωρίς να ταυτίζεται όμως μ' αυτό, κάτι που μας οδηγεί στην υπόθεση πως πρόκειται για άτομα συγγενικού με αυτό είδους και πιθανότατα του *Anisakis brevispiculata*. Παρόμοια υπόθεση μπορεί να γίνει και για τα άτομα KB00 και KB21. Τις υποθέσεις αυτές ενισχύει η μορφολογική παρατήρηση των ατόμων αυτών, στοιχεία της οποίας τα ταυτίζουν με το είδος *Anisakis brevispiculata*. Η τελευταία ομάδα ατόμων που διακρίνουμε από την παρατήρηση των δένδρων (KB7, KBX, KB23, KB16) παρά το ότι βρίσκεται εντός του γένους *Anisakis* εκτιμούμε πως δεν ανήκει στο γένος αυτό αλλά πιθανότατα στο γένος *Pseudoterranova*, εκτίμηση που στηρίζεται και πάλι στην παρατήρηση των μορφολογικών χαρακτήρων.

---

## 4 - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Στον Πίνακα 3 συνοψίζονται τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, ο ξενιστής στον οποίο βρέθηκαν, καθώς και το είδος στο οποίο τελικά φαίνεται να ανήκουν.

Έτσι έχουμε αναλυτικότερα, την αναγνώριση 10 παρασίτων ως άτομα του είδους *Anisakis typica*, 6 από τα οποία βρέθηκαν στον ξενιστή *Lagenodelphis hosei* (ποσοστό 85,7% επί του συνόλου ειδών στον ξενιστή) ενώ τα υπόλοιπα 4 προήλθαν από το *Stenella attenuata* (ποσοστό 100% των ατόμων του δεύτερου δελφινιού ξενιστή). Αξίζει εδώ να σημειωθεί πως η μορφολογική παρατήρηση περισσότερων παρασίτων που προερχόταν από τον ξενιστή αυτό και η αναφορά δεδομένων της οποίας δε γίνεται στα πλαίσια της παρούσας εργασίας έδειξε την ταυτοποίησή τους με το είδος *Anisakis typica* επίσης σε ποσοστό 100%. Η σύγκριση δεδομένων επεξεργασίας αλληλουχίας, προτύπων RFLP καθώς και μορφολογικών χαρακτήρων συνηγορούν στην περίπτωση των 10 αυτών ατόμων στο χαρακτηρισμό τους ως *Anisakis typica*.

Ένα άτομο χαρακτηρίστηκε ως *Anisakis pegreffii*, προερχόμενο από τον ξενιστή *Lagenodelphis hosei* (ποσοστό 14,3%) ενώ άλλο ένα ως *Anisakis physeteris*, προερχόμενο από τον ξενιστή *Kogia breviceps* (ποσοστό 6,25%). Και για τα δύο αυτά άτομα τα αποτελέσματα της RFLP έδωσαν χαρακτηριστικά πρότυπα κατάταξης (συγκρινόμενα με πρότυπα από D' Amelio *et al.*, 2000), ενώ η θέση τους στο φυλογενετικό δένδρο ήταν για το άτομο KB10 μαζί με το άτομο αναφοράς του *Anisakis physeteris* (τόσο στο UPGMA όσο και στο Neighbor Joining tree) και για το άτομο LH4 μαζί με το άτομο αναφοράς του *Anisakis pegreffii* στο UPGMA tree και στην ομάδα αδελφών ειδών του *Anisakis simplex* στο Neighbor Joining tree, προφανώς λόγω διαφορών στον τρόπο υπολογισμού των παραμέτρων κατασκευής του δένδρου στην κάθε περίπτωση. Αναφορικά με το LH4 και τα μορφολογικά δεδομένα ταυτίζονται με τα κλειδιά κατάταξης στο *Anisakis pegreffii* ενώ για το

KB10 τα μορφολογικά δεδομένα δεν είναι επαρκή λόγω κακής κατάστασης του δείγματος προς παρατήρηση.

Το *Anisakis brevispiculata* αποτελούσε παλιότερα συνώνυμο του *Anisakis physeteris*. Αναγνωρίστηκε και πάλι ως ισχύον είδος από Mattiucci et al., (2001), λόγω διαφορών τόσο στο γενετικό τους προφίλ όσο και σε κάποιους μορφολογικούς χαρακτήρες, π.χ. μήκος γεννητικών οργάνων αρσενικών μικρότερο στο είδος αυτό σε σύγκριση με του *Anisakis physeteris*. Η κατάσταση στη μελέτη αυτή περιπλέκεται με το γεγονός του ότι φαίνεται να εμφανίζονται δύο είδη με τα χαρακτηριστικά αυτά (μπορούμε να τα ονομάσουμε προκαταρκτικά *Anisakis brevispiculata* 1 και 2). Μορφολογικά, τα δείγματα KB1 και KB6 χαρακτηρίστηκαν ως μέλη του *Anisakis brevispiculata*. Μετά τη μοριακή ανάλυση όμως, το πρώτο δείχνει να ταυτίζεται με τα KB00 και KB21 (από στοιχεία προτύπου RFLP) ενώ το δεύτερο με τη δεύτερη ομάδα ατόμων (KB22, DP3, DP5, KB11) σύμφωνα με τα δεδομένα των φυλογενετικών δένδρων. Κρίνοντας από τα πρότυπα των RFLP, στη δεύτερη αυτή ομάδα εντάσσονται και τα άτομα DP1 και DP2. Ξενιστής και των 11 ατόμων που φαίνεται να ανήκουν στο είδος αυτό είναι η φάλαινα *Kogia breviceps* (68,8% του συνόλου παρασίτων που βρέθηκαν στον ξενιστή).

Άλλα 4 παράσιτα του ίδιου ξενιστή που δίνουν κοινό πρότυπο RFLP και κατατάσσονται μαζί στο φυλογενετικό δένδρο φαίνεται πως αποτελούν μέλη του γένους *Pseudoterranova* και συγκεκριμένα του είδους *Pseudoterranova ceticola*, γεγονός που ενισχύει η μορφολογική παρατήρηση ατόμων της ομάδας.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΞΕΝΙΣΤΗΣ	ΕΙΔΟΣ
DP1	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 2
DP2	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 2
DP3	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 2
DP5	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 2
KB00	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 1
KB1	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i>
KB10	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis physeteris</i>
KB11	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 2
KB16	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Pseudoterranova ceticola</i>
KB21	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 1
KB22	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 2
KB23	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Pseudoterranova ceticola</i>
KB6	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i> 2
KB7	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Pseudoterranova ceticola</i>
KB9	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Anisakis brevispiculata</i>
KBX	<i>Kogia breviceps</i>	<i>Pseudoterranova ceticola</i>
LH16	<i>Lagenodelphis hosei</i>	<i>Anisakis typica</i>
LH18	<i>Lagenodelphis hosei</i>	<i>Anisakis typica</i>
LH19	<i>Lagenodelphis hosei</i>	<i>Anisakis typica</i>
LH4	<i>Lagenodelphis hosei</i>	<i>Anisakis pegreffii</i>

LH6	<i>Lagenodelphis hosei</i>	<i>Anisakis typica</i>
LH7	<i>Lagenodelphis hosei</i>	<i>Anisakis typica</i>
LH9	<i>Lagenodelphis hosei</i>	<i>Anisakis typica</i>
SA1	<i>Stenella attenuata</i>	<i>Anisakis typica</i>
SA3	<i>Stenella attenuata</i>	<i>Anisakis typica</i>
SA4	<i>Stenella attenuata</i>	<i>Anisakis typica</i>
SA5	<i>Stenella attenuata</i>	<i>Anisakis typica</i>

Πίνακας 3

Τα ενήλικα άτομα των *Anisakis typica* και της ομάδας του *Anisakis simplex* έχουν ως τελικούς ξενιστές δελφινοειδή (Davey, 1971; Mattiucci *et al.*, 1997), ενώ εκείνα των *Anisakis ziphidarum* και *Anisakis physeteris* έχουν ως τελικούς ξενιστές φάλαινες (Davey, 1971; Paggi *et al.*, 1998). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί απόλυτα με τα δεδομένα της παρούσης μελέτης καθώς στα δύο δελφίνια ξενιστές αναγνωρίστηκαν άτομα των δύο πρώτων ειδών ενώ στην *Kogia breviceps* αναγνωρίστηκαν άτομα των στενά συγγενικών ειδών *Anisakis brevispiculata* και *Anisakis physeteris*.

Οι φάλαινες του είδους *Kogia breviceps* προτιμούν τα ζεστά τροπικά νερά ενώ συνηθίζεται να παραμένουν σε βαθιά νερά για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Οι διατροφικές τους συνήθειες περιλαμβάνουν την κατανάλωση καλαμαριών, οστρακόδερμων και βαθυπελαγικών κυρίως ψαριών (Watson, 1981), ζωικοί πληθυσμοί που προφανώς αποτελούν ενδιάμεσους ξενιστές των Anisakidae.

Το είδος του *Lagenodelphis hosei* προτιμά επίσης τα τροπικά νερά και βρίσκεται στο βόρειο τμήμα του κόλπου του Μεξικού (Rice, 1998). Βρίσκεται συνήθως σε μέσο βάθος ενώ οι διατροφικές του συνήθειες περιλαμβάνουν μεσοπελαγικά ψάρια καλαμάρια και γαρίδες. Απαντάται σε ομάδες πολλών ατόμων ίδιου αλλά και διαφορετικών ειδών, μεταξύ των οποίων και το *Stenella attenuata* (Dolar, 2002). Το δεύτερο αυτό είδος, αποτελεί και το πιο κοινό δελφίνι στον κόλπο του Μεξικού (Lang, 1996), με τις διατροφικές του συνήθειες να περιλαμβάνουν μικρά ψάρια της επιφάνειας συμπεριλαμβανομένων ειδών τόνου, σημαντικών για την αλιεία και προφανώς ενδιάμεσων ξενιστών ειδών *Anisakis*.

Οι συνήθειες των τελικών ξενιστών των παρασίτων δίνουν χρήσιμες πληροφορίες και για την κατανομή των ιδίων στο υδάτινο περιβάλλον και των διακεκριμένων θέσεων που ενδεχομένως κατέχουν τα διαφορετικά είδη εντός αυτού. (Χαρακτηριστικό παράδειγμα το *Anisakis typica*, η προσαρμογή του οποίου και στη συγκεκριμένη μελέτη φαίνεται να γίνεται καλύτερα στα θερμότερα επιφανειακά νερά).

Συχνά ανάμεσα σε παράσιτα και ξενιστές παρατηρήθηκε στενή σχέση της εκτιμώμενης εξελικτικής τους πορείας. Σήμερα υπάρχουν κατάλληλες γενετικές μέθοδοι εκτίμησης των γενετικών σχέσεων μεταξύ συγγενικών ειδών παρασίτων και σύγκρισης αυτών με εκείνες των ξενιστών τους (Nascetti *et al.*, 1998).

Στην έρευνα των Nascetti *et al.*, (1998) μέσω ισοενζυμικής ανάλυσης κατέστη δυνατός ο γενετικός χαρακτηρισμός των τριών ειδών της ομάδας *Anisakis simplex*, καθώς και των *Anisakis ziphidarum*, *Anisakis physeteris* και *Anisakis brevispiculata*. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν πως το *Anisakis ziphidarum* που προήλθε από



τις φάλαινες *Ziphius cavirostris* και *Mesoplodon layardii* της οικογένειας Ziphiidae, σχετίζεται περισσότερο με τα υπόλοιπα είδη της ομάδος *Anisakis simplex* ( $D_{Nei}=1,65$ ) που προήλθαν από τελικούς ξενιστές άλλων οικογενειών κητοειδών όπως Phocoenidae, Delphinidae και Monodontidae, παρά με άτομα *Anisakis physeteris* και *Anisakis brevispiculata* ( $D_{Nei}=3,09$ ) που συλλέχθηκαν από τις φάλαινες *Physeter catodon* και *Kogia breviceps* αντιστοίχως.

Αντίστοιχα με το παρατηρούμενο εξελικτικό πρότυπο ειδών του *Anisakis*, οι τελικοί ξενιστές της οικογένειας Ziphiidae είναι περισσότερο σχετιζόμενοι με αυτούς των οικογενειών Phocoenidae, Delphinidae και Monodontidae παρά με τις φάλαινες της οικογένειας Physeteridae. Τέτοια ευρήματα υποδεικνύουν ενδεχόμενη παράλληλη εξέλιξη κητοειδών και των ενδοπαρασίτων τους (Nascetti *et al.*, 1998). Στην παρούσα μελέτη, το UPGMA δένδρο που έγινε από τα δεδομένα αλληλούχησης των ειδών προς μελέτη έδειξε παρόμοια αποτελέσματα με την προηγούμενη έρευνα σε σχέση με τη συγγένεια των ειδών των παρασίτων που μελετήθηκαν. Επιπλέον σε διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους ξενιστή *Kogia breviceps* παρατηρήθηκε διαχωρισμός σε γενετικά διακριτές ομάδες του είδους *Anisakis brevispiculata*, γεγονός που μπορεί να υποδείξει πιθανή τρέχουσα διαδικασία διαχωρισμού ειδών σε ομάδες ξενιστών και παρασίτων, χωρίς φυσικά κάτι τέτοιο να μπορεί να στηριχθεί αποκλειστικά στα έως τώρα δεδομένα.

Οι μελέτες που περιλαμβάνουν τη χρησιμοποίηση γενετικών δεικτών αναμένεται να αυξήσουν δραματικά τις γνώσεις μας σε σχέση με την κατάταξη και την εξέλιξη των παρασίτων αυτών με άμεσα θεωρητικά και πρακτικά αποτελέσματα. Ένα πρώτο θέμα αφορά τους μηχανισμούς ειδογένεσης στα ενδοπαρασίτα. Μέχρι πρόσφατα, το θεωρούμενο ως καταλληλότερο μοντέλο ήταν αυτό της συμπάτριας ειδογένεσης, που περιελάμβανε την αλλαγή ξενιστή του παρασίτου και ακολούθως την κοινή εξελικτική πορεία των δύο μέχρι και τη δημιουργία νέου είδους. Τα προφανή μειονεκτήματα του μοντέλου αυτού οδήγησαν στην υιοθέτηση ενός άλλου για τα ενδοπαρασίτα, εκείνου της περιπάτριας ειδογένεσης. Συμπεράσματα γενετικών αναλύσεων από τους νηματώδεις της οικογένειας Anisakidae που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα δείχνουν πως η προσαρμογή σε νέο ξενιστή και η ειδογένεση είναι αυστηρά σχετιζόμενες με τη γεωγραφική απομόνωση των ξενιστών. Στις περιπτώσεις των ομάδων *Anisakis simplex*, *Contracaecum osculatum* και *Pseudoterranova decipiens*, τέτοιες διαδικασίες προφανώς συνέβησαν σε διαφορετικές χρονικές περιόδους, όταν συνέβησαν ακραίες κλιματικές αλλαγές. Κατά τη διάρκεια της εποχής των παγετώνων (μεγάλη μείωση του επιπέδου της θάλασσας) μικροί πληθυσμοί ξενιστών και των παρασίτων τους μπορούσαν να είχαν παραμείνει απομονωμένοι, προάγοντας τη γενετική απόκλιση και τη συνεξελικτική τους πορεία, ενώ κατά τις μεσοπαγετικές περιόδους μπορούσε να ευνοηθεί η αλλαγή ξενιστών (Nascetti *et al.*, 1993)

Ένα δεύτερο θέμα μεγάλης πρακτικής σημασίας αφορά την ακριβή ταυτοποίηση των παρασίτων στα στάδια της προνύμφης. Στους νηματώδεις της Anisakidae η ειδογένεση συνοδεύεται από ελάχιστες μορφολογικές διαφοροποιήσεις οι οποίες πολύ δύσκολα γίνονται διακριτές στα πρώτα στάδια ζωής του νηματώδους. Τα μορφολογικά δεδομένα και οι μοριακές αναλύσεις μπορούν να συνδυαστούν για τον αποτελεσματικότερο χαρακτηρισμό των ειδών που δε μπορεί να επιτευχθεί μόνο με μια προσέγγιση (Nadler, 1990). Η αναγνώριση της προνύμφης του νηματώδους θα μπορέσει να επιτρέψει το συσχετισμό του κάθε είδους με τα διαφορετικά παθολογικά αποτελέσματα που μπορούν να προκληθούν στον άνθρωπο (π.χ. γαστρική και εντερική Ανισακίδωση, Pseudoterranovosis, Contracaecosis και άλλες παρόμοιες

άνθρωποζωνώσεις). Επιπλέον θα είναι δυνατός ο καθορισμός των γεωγραφικών περιοχών και των εποχών του μεγαλύτερου κινδύνου μόλυνσης, όπως επίσης και τα είδη ψαριών που σχετίζονται περισσότερο με τη μετάδοση των ασθενειών στον άνθρωπο. Τέλος, τέτοια δεδομένα μπορούν να δώσουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τον κύκλο ζωής και μόλυνσης υδάτινων πληθυσμών από τα παράσιτα αυτά που παρουσιάζουν μεγάλη οικονομική σημασία.

Οι γενετικοί δείκτες που καθορίστηκαν από PCR-RFLP αναλύσεις αποτελούν σημαντική πρακτική εφαρμογή στη μοριακή διάγνωση της ανθρώπινης Ανισακίδωσης. Εφόσον ο ακριβής χαρακτηρισμός ειδών *Anisakis* είναι απαραίτητος, ειδικά όταν συνυπάρχουν πολλά από αυτά, οι γενετικοί δείκτες που αναπτύχθηκαν βρίσκουν εφαρμογή τόσο σε αδελφά όσο και σε ανεξάρτητα είδη του γένους, ανεξάρτητα με το αναπτυξιακό τους στάδιο (D' Amelio *et al.*, 2000). Πέρα από τις τεχνικές των PCR-RFLP αναλύσεων για τη διάκριση ειδών της οικογένειας αυτής, χρήσιμη έχει αποδειχθεί και η μελέτη του rDNA κυρίως για εξελικτικές μελέτες των ειδών. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά του είναι η ύπαρξη σ' αυτό περιοχών με διαφορετικούς εξελικτικούς ρυθμούς. Οι κωδικοποιούσες περιοχές εξελίσσονται πιο αργά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συγκρίσεις σχετικά απομακρυσμένων ειδών (επίπεδα γένους, οικογένειας και μεγαλύτερα) ενώ άλλες περιοχές όπως αυτές των ITS και ETS εξελίσσονται ταχύτερα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για συγκρίσεις πληθυσμών στενά συγγενικών ειδών.

## ΑΝΑΦΟΡΕΣ-ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrams ES., Stanton Jr. VP. (1992) Use of denaturing gradient gel electrophoresis to study conformational transitions in nucleic acids. *Methods Enzymol.* **212**, 71-104.
- Anderson RC 1992. *Nematode Parasites of Vertebrates*, CAB International, Cambridge University Press, London, 578 pp.
- Anderson TJC., Romero-Abal ME. And Jaenike J (1993) Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. *Parasitology* **107**, 319-334.
- Anderson TJC, Blouin MS, Beech RN (1998) Population biology of parasitic nematodes: application of genetic markers. *Adv. Parasitol.* **41**, 220-283.
- Berland, B. (1961) Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, **2**, 1-50.
- Bullini L., Arduino P., Cianchi R., Nascetti G., D'Amelio S., Mattiucci S., Paggi L., Orecchia P., Plotz J., Berland B., Smith J.W., Bratney J. (1997). Genetic and ecological research on Anisakid endoparasites of fish and marine mammals in the Antarctic and Arctic-Boreal regions. In: *Antarctic Communities. Species, Structure and Survival*. (Battaglia, Valencia & Walton Eds). Cambridge University Press: 39-50.
- D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Brandonisio O, Lucarelli G, Doronzo F, Paggi L. (1999) Diagnosis of a case of gastric anisakidosis by PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *Parassitologia*. **41**, 591-3.
- D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanco 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. *Int J Parasitol.* **30**, 223-6.
- Davey, J.T. (1971) A revision of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Ascaridida). *Journal of Helminthology*, **45**, 51-72.
- Deardoff T.L. and R.M. Overstreet (1981) *Terranova ceticola* n.sp. (Nematoda: Anisakidae) from the dwarf sperm whale *Kogia simus* (Owen) in the gulf of Mexico. *Syst. Parasitol.* **3**, 25-28.
- Diesing, K.M. (1860) Revision der Nematoden. *Akademie der Wissenschaften zu Wien, Sitzungsberichte, Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse*, **42**, 595-763.
- Dolar ML (2002) Fraser's Dolphin - *Lagenodelphis hosei*. In: Encyclopedia of marine mammals (Perrin WF, Würsig B, Thewissen JGM, eds.) *Academic Press, San Diego*, 485 - 487
- Fagerholm H-P. (1989) Intra-specific variability of the morphology in a single population of the seal parasite *Contracaecum osculatum* (Rudolphi) (Nematoda: Anisakidea), with a redescription of the species. *Zoologica Scripta*, **18**: 33-41.
- Feldmeier H, Poggensee G. (1991) Human anisakiasis: epidemiology, pathophysiology, and clinical management, *Hospimedica* **46-51**.
- Felsenstein J., (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**:783-791.
- Gambell R. (1979) The blue whale. *Biologist* **26**:209-215.
- Gasser RB., Nansen P., Guldborg P., (1996a) Fingerprinting sequence variation in ribosomal DANN of parasites by DGGE. *Mol. Cell Probes* **10**, 99-105.
- Gasser RB., Monti JR. (1997) Identification of parasitic nematodes by PCR-SSCP of ITS-2 rDNA. *Mol. Cell Probes* **11**, 201-209.
- Gasser RB., Monti JR., BAO-Zhen Q., Polderman AM., Nansen P., Chilton NB (1998a) A mutation scanning approach for the identification of hookworm species and analysis of population variation. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2**, 303-312.
- Gasser RB., Zhu XQ., Chilton NB., Newton LA., Nedergaard T., Guldborg P. (1998e) Analysis of sequence homogenization in rDNA arrays of *Haemonchus contortus* by denaturing gradient gel electrophoresis. *Electrophoresis* **19**, 2391-2395.
- Gasser RB, Rossi L, Zhu X. (1999) Identification of *Nematodirus* species (Nematoda: Molineidae) from wild ruminants in Italy using ribosomal DNA markers. *Int J Parasitol.* **29**, 1809-17.
- George-Nascimento, M and X Urrutia (2000) *Pseudoterranova cattani* sp. nov. (Ascaridoidea: Anisakidae), a parasite of the South American sea lion, *Otaria byronia* De Blainville from Chile *Rev. Chilena Hist. Nat.* **73**, 93-98.
- Johnson AM., Baverstock BP. (1989) Rapid ribosomal RNA sequencing and the phylogenetic analysis of protists. *Parasitol. Today* **5**, 102-105.
- Kikuchi Y, Ishikura H, Kikuchi K (1990) In: Ishikura H, Kikuchi K, Intestinal anisakiasis in Japan. Infected fish, seroimmunology, diagnosis and prevention. Springer, Tokyo Berlin Heidelberg, pp 129-143
- Kumar Sudhir, Koichiro Tamura, Ingrid B. Jakobsen, and Masatoshi Nei (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Bioinformatics

- Lang, (1996) B. Pan-Tropical Spotted Dolphins, *Stenella Attenuata*. Minerals Management Service Gulf of Mexico OCSRegion. <http://www.mms.gov/omm/gomr/homepg/regulate/environ/marmam/pantrop.html>
- Liu Q., Sommer SS., (1995) Restriction endonuclease fingerprinting (REF): a sensitive method for screening mutations in long contiguous segments of DNA. *BioTechniques* **18**,470-477.
- Love JM., Knight AM., McAleer MA., Todd JA., (1990) Towards construction of a high resolution map of the mouse genome using PCR-analysed microsatellites. *Nucl. Acids Res.* **18**, 4123-4130.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Bullini, L., Orecchia, P. & Paggi, L (1986) Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae). *Parasitology*, **93**, 383-387.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Cianchi, R., Paggi, L., Arduino, P., Margolis, L., Bratney, J., Webb, S.C., D'Amelio, S., Orecchia, P. & Bullini, L. (1997) Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Journal of Parasitology*, **83**, 401-416
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Ishikura, H., Kikuchi, K., Sato, N., Cianchi, R. & Bullini, L. (1998) Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). *Systematic Parasitology*, **40**, 81-92.
- Mattiucci, S., Paggi L., Nascetti G., Abollo E., Webb, S.C., Pascual, S., Cianchi, R. & Bullini, L. (2001) Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). *International Journal for Parasitology*, **31**, 9-14.
- McManus and Bowles (1996) Molecular genetic approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int. J. Parasitol.* **26**, 687-704.
- Miesfeld L Roger (1999) Applied molecular genetics
- Moller H. and Anders K. (1986) Diseases and parasites of marine fish. Kiel: Moller pp365
- Nadler SA (1990) Molecular approaches to study helminth population genetics and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* **20**, 11-29.
- Nascetti G., Paggi L., Orecchia P., Mattiucci S., Bullini L. (1983). Two sibling species within *Anisakis simplex* (Ascaridida: Anisakidae). *Parassitologia*, **25**: 306-307.
- Nascetti, G., Paggi, L., Orecchia, P., Smith, J.W., Mattiucci, S. & Bullini L. (1986) Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North East Atlantic. *International Journal for Parasitology*, **16**, 633-640.
- Nascetti G., Cianchi R., Mattiucci S., D'Amelio S., Orecchia P., Paggi L., Bratney J., Berland B., Smith J.W., Bullini L. (1993). Three sibling species within *Contracaecum osculatum* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) from the Atlantic Arctic-boreal region: reproductive isolation and host preferences. *International Journal for Parasitology*, **23**: 105-120
- Nascetti G., Mattiucci S., Cianchi R., Paggi L., Webb S.C., Bullini L. (1998). Host-parasite co-evolution between cetaceans and their anisakid endoparasites. *Parassitologia*, **40** (Suppl. 1): 116.
- Orecchia P, Paggi L, Mattiucci S, Smith JW, Nascetti G, Bullini L. (1986) Electrophoretic identification of larvae and adults of *Anisakis* (Ascaridida: Anisakidae). *J Helminthol.* **60**,331-9.
- Paggi L., Orecchia P., Bullini L., Nascetti G., Mattiucci S. (1983). Electrophoretic identification of *Anisakis* larvae from Mediterranean and North Atlantic (Ascaridida: Anisakidae). *Parassitologia*, **25**: 315-316.



- Paggi L., Nascetti G., Cianchi R., Orecchia P., Mattiucci S., D'Amelio S., Berland B., Bratney J., Smith J.W., Bullini L. (1991). Genetic evidence for three species within *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridida, Ascaridoidea) in the North Atlantic and Norwegian and Barents Seas. *International Journal for Parasitology*, **21**: 195-212.
- Paggi, L., Nascetti, G., Webb, S.C., Mattiucci, S., Cianchi, R. & Bullini, L. (1998) A new species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae) from beaked whales (Ziphiidae): allozyme and morphological evidence. *Systematic Parasitology*, **40**, 161-174.
- Paggi L, Mattiucci S, Gibson DI, Berland B, Nascetti G, Cianchi R, Bullini L. (2000) *Pseudoterranova decipiens* species A and B (Nematoda, Ascaridoidea): nomenclatural designation, morphological diagnostic characters and genetic markers. *Syst Parasitol.* **45**,185-97.
- Rice DW (1998) Marine mammals of the world: systematics and distribution. Society for Marine Mammalogy, Special Publication Number 4 (Wartzok D, Ed.), Lawrence, KS. USA
- Smith, J.W. & Wootten, R. (1978) *Anisakis* and Anisakiasis. *Advances in Parasitology*, **16**, 93-163.
- Smith, JW (1983) *Anisakis simplex*: morphology and morphometry of larvae of euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. *J Helminthol.* **57**: 205-224
- Tautz D., (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Acids Res.* **17**, 6463-6471.
- van Herwerden L., Blair D., Agatsuma T., (2000) Multiple lineages of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit I (NDI) in parasitic helminths: implications for molecular evolutionary studies of facultative anaerobic eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **51**: 339-352.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van-de-Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* **23**, 4407-4414.
- Watson, L. (1981). *Sea Guide to Whales of the World*. London: Hutchinson and Co.
- Williams, H. and Jones, A. 1994. Parasitic worms of fish. Taylor & Francis Ltd, London., 593 pp.
- Williams JGK., Kubelik AR., Livak KJ., Rafalski JA., Tingey SV. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* **18**, 6531-6535.
- Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB (1998) Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol.* **28**,1911-21.
- Zhu X, Chilton NB., Beveridge I., Gasser RB. (1998a) Detection of sequence variation in parasite ribosomal DNA by electrophoresis in agarose gels supplemented with a DNA intercalating agent. *Electrophoresis* **19**, 1366-1373.
- Zhu X, Jacobs DE, Chilton NB, Sani RA, Cheng ang Gasser RB. (1998b) Molecular characterization of a *Toxocara* variant from cats in Kuala Lumpur, Malaysia. *Parasitology* **117**, 155-164.
- Zhu X., Gasser RB., Podolska M., Chilton NB. (1998c) Characterization of anisakid nematodes of potential zoonotic significance by ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* **28**, 1911-1921.
- Zhu X, D'Amelio S, Paggi L, Gasser RB. (2000) Assessing sequence variation in the internal transcribed spacers of ribosomal DNA within and among members of the *Contracaecum osculatum* complex (Nematoda: Ascaridoidea: Anisakidae). *Parasitol Res.* **86**,677-83.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

### ● Διαλύματα-Αντιδραστήρια

#### ***BSA(Promega)***

200X 20mg/mL

#### ***Buffer E (Promega) για TaqI***

Tris-HCl 6mM

MgCl<sub>2</sub> 6mM

NaCl 100mM

DTT 1mM

pH 7.5 (37°C)

#### ***Buffer C (Promega) για HinfI και HhaI***

Tris-HCl 10mM

MgCl<sub>2</sub> 10mM

NaCl 50mM

DTT 1mM

pH 7.9 (37°C)

#### ***Promega Agarose***

Melting Point 87-89°C

Gelling Point 36-39°C

Moisture <10%

Sulfate <0,15%

DNase/RNase free

#### ***TBE 5X pH 8.3 (1000mL)***

54g Tris Borate

27,5g Boric Acid

20mL 0,5M EDTA(pH 8,0)

### ● Ηλεκτροφορήσεις ελέγχου PCR-Πέψης:

#### ***DNA fluor® (BioMedic)***

1. Επώαση δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση για 5 min. στους 60°C με αναλογία όγκων (V<sub>DNA fluor</sub>:V<sub>δείγματος</sub>) 1:10 και Loading Buffer 1X 2:10.
2. Loading του μίγματος στο gel.

Η DNA fluor είναι ένα μόριο μεγάλων διαστάσεων, υδατοδιαλυτό και μη ικανό να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη.

Πλεονεκτήματα της χρήσης της αποτελούν:

-Η ευκολία χρήσης

-Η απουσία τοξικότητας

-Η αποφυγή προβλημάτων χρωματισμού του gel οφειλόμενα στο βρωμιούχο αιθίδιο (π.χ. ανομοιογένεια εξάπλωσης στο gel)

- $10^5$  φορές υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης στο DNA απ' ό τι το βρωμιούχο αιθίδιο

- $10^4$  φορές μικρότερη απαιτούμενη συγκέντρωση από το βρωμιούχο αιθίδιο για το χρωματισμό του DNA

### **Gel αγαρόζης 1% - ηλεκτροφόρηση**

60mL TBE 0,5X

0,6g αγαρόζης

### **Gel αγαρόζης 2% - Πέψη προϊόντων PCR**

60mL TBE 0,5X

1,2g αγαρόζης

### **●Πρωτόκολλα πειραμάτων:**

#### **Wizard™ Genomic DNA Purification kit (Promega)**

1. Για κάθε δείγμα προς ανάλυση ετοιμάστηκε ένα μίγμα αποτελούμενο από 120μL EDTA (pH 8.0) και 500μL Nuclei Lysis Solution (Promega) σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα διατηρημένο σε πάγο.

2. Από το μίγμα αυτό 600μL προστέθηκαν σε κάθε δείγμα μαζί με 17.5μL Πρωτεΐνασης K 20mg/mL.

3. Στη συνέχεια ακολούθησε 3ωρη επώαση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο και σε θερμοκρασία 55 °C ενώ μεσολάβησε έντονη ανάδευση ανά διαστήματα της μίας ώρας.

4. Με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3μL διαλύματος RNase A (4mg/mL σε DNA Rehydration Solution. Βρασμένη για 10min για καταστροφή των DNAσών) στα δείγματα, τα οποία αναδεύτηκαν με αναστροφή 5 φορές και τοποθετήθηκαν για νέα επώαση 30 min. σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C.

5. Μετά από περίπου 5 λεπτά, διάστημα απαραίτητο για να επανέλθουν τα δείγματα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, είναι απαραίτητο ένα βήμα ιζηματοποίησης των προϊόντων της λύσης, χρησιμοποιώντας 200μL Protein Precipitation Solution (Promega) για κάθε δείγμα και έντονη ανάδευση με vortex για 20sec.

6. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε πάγο και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στις 16.000 στροφές / λεπτό. Οι πρωτεΐνες σχημάτισαν λευκό ίζημα στο κάτω μέρος του σωλήνα.

7. Το υπερκείμενο το οποίο περιείχε και το DNA αφαιρέθηκε προσεκτικά και τοποθετήθηκε σε νέο σωληνάκι Eppendorf του 1.5mL που περιείχε 600μL ισοπροπανόλης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ ακολούθησε ασθενής ανάδευση.

8. Μετά από μία δεύτερη φυγοκέντριση στις 16.000 στροφές / λεπτό για 3 λεπτά, το υπερκείμενο αφαιρέθηκε με ακρίβεια αφήνοντας το DNA στο κάτω μέρος του σωλήνα με τη μορφή μικρής επιφάνειας λευκού ιζήματος.
9. Στο ίζημα προστέθηκαν 600μL αιθανόλης 70% για την έκπλυση του DNA και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου για 5 λεπτά.
10. Η αιθανόλη απομακρύνθηκε πολύ προσεκτικά καθώς στη φάση αυτή το ίζημα του DNA δεν είναι σταθερά προσκολλημένο στα τοιχώματα του σωλήνα και τα δείγματα αφέθηκαν εκτεθειμένα στον αέρα για 10 περίπου λεπτά με σκοπό την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης.
11. Τελικά, το DNA επαναδιαλύθηκε σε 100μL DNA Rehydration Solution (10mM Tris-HCl pH7.4; 1mM EDTA pH8.0) και επώαστηκε για μία νύχτα στους 4 °C. Εναλλακτικά θα μπορούσε να ενυδατωθεί με επώαση στους 65 °C για 1 ώρα. Το DNA διατηρήθηκε στους -20 °C.

### ***Nucleo-spin extract 2 in 1 (MACHEREY-NAGEL)***

1. 180μL buffer NT2 (MACHEREY-NAGEL) προστέθηκαν σε 45μL προϊόντος PCR (αναλογία 4:1) και μεταφέρθηκαν εντός της στήλης καθαρισμού που βρισκόταν σε σωλήνα των 2mL.
2. Ακολούθησε φυγοκέντριση ενός λεπτού στις 14000 στροφές. Το DNA μετά τη φυγοκέντριση βρισκόταν εντός του φίλτρου της στήλης καθαρισμού για το λόγο αυτό απορρίφθηκε το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής των 2mL και στη στήλη προστέθηκαν 600μL buffer NT3 (MACHEREY-NAGEL).
3. Ακολούθησε νέα φυγοκέντριση ενός λεπτού στις 14000 στροφές, απομακρύνθηκε και πάλι το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής και στη στήλη καθαρισμού τοποθετήθηκαν άλλα 200μL buffer NT3 (MACHEREY-NAGEL) για να φυγοκεντρηθούν στις 14000 στροφές για 2 λεπτά και το περιεχόμενο του σωλήνα απομακρύνθηκε.
4. Για την απομάκρυνση όποιας ποσότητας αιθανόλης (περιέχεται στο NT3) που θα μπορούσε να επηρεάσει τις περαιτέρω αντιδράσεις οι στήλες τοποθετήθηκαν ανοικτές σε υδατόλουτρο στους 70°C για 4 λεπτά έτσι ώστε να καταφέρουμε την εξάτμισή της.
5. Τελικά οι στήλες μεταφέρθηκαν σε Eppendorff του 1,5mL και προστέθηκαν 30μL NE Elution Buffer (5mM Tris/HCl pH 8,5) (MACHEREY-NAGEL).
6. Μετά από ένα περίπου λεπτό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, ακολούθησε τελική φυγοκέντριση ενός λεπτού και το DNA συλλέχθηκε εντός του σωλήνα.