

Występowanie nicieni *Contraecum osculatum* w wątrobach dorszy z Morza Bałtyckiego

Aneta Belcik, Ewa Bilaska-Zajac, Mirosław Różycki, Ewelina Antolak, Katarzyna Grądziel-Krukowska, Iwona Mizak, Maciej Kochanowski, Jacek Karamon, Tomasz Cencek

z Zakładu Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Occurrence of *Contraecum osculatum* in the liver of cods from the Baltic Sea

Belcik A., Bilaska-Zajac E., Różycki M., Antolak E., Grądziel-Krukowska K., Mizak I., Kochanowski M., Karamon J., Cencek T., Department of Parasitology and Invasive Diseases, National Veterinary Research Institute in Puławy

Cods living in the Baltic Sea may be intermediate or paratenic hosts of the zoonotic nematodes from the *Anisakidae* family. Both, meat and the liver of this fish species are products that blend well in the diet of consumers due to the richness of micronutrients, but their consumption may involve the risk of anisakidosis or development of the allergic reactions to parasite antigens. However, there are only few studies on the occurrence of *Anisakidae* larvae in cod's liver. The aim of this study was to determine the extensity of infection with *Anisakidae* nematodes of cods liver fished in the Baltic Sea. The investigations of the collected samples (508 in 2016 and 848 in 2017), showed that the percentage of infected livers was 46% in 2016 and 37.5% in 2017. Based on the molecular studies, the majority of detected larvae were identified as *Contraecum osculatum* (99.82%), and just one larvae has appeared to be *Anisakis simplex* (0.18%). The highest rates of infection with *C. osculatum* nematodes in years 2016–2017 were recorded in the areas of South Bornholm (57.0–36.3%), and North Bornholm (47.7–43.0%), and the lowest intensity of infection was found in the Kolobrzeszko-Darłowskie area (23.9%) in 2016. The frequent occurrence of *C. osculatum* in the liver of cods caught in the Baltic Sea may pose a danger of anisakidosis to humans in case of consumption of live larvae, as well as allergic reactions to antigens of these nematodes.

Keywords: cods, anisakidosis, nematodes, zoonosis.

Morze Bałtyckie jest morzem śródlądowym o niskim zasoleniu, będącym siedliskiem wielu gatunków ryb zarówno słonowodnych, jak i słodkowodnych. Do najczęściej odławianych ryb w Morzu Bałtyckim należą: śledź (*Clupea harengus membras*), dorsz (*Gadus morhua*), szprot (*Sprattus sprattus*), stornia (*Platichthys flesus*), okoń (*Perca fluviatilis*), leszcz (*Abramis brama*) i płoć (*Rutilus rutilus*). Według danych Morskiego Instytutu Rybackiego, w 2018 r. łącznie odłowiono ponad 112 tys. ton ryb, w tym największą ilość stanowiły: śledź (28 769 ton), szprot (64 275 ton), stornia (11 138 ton), a także dorsz (3725 ton; 1).

Stosunkowo duże zanieczyszczenie środowiska, w którym bytują te gatunki ryb, osłabia ich kondycję i sprawia, że są podatne na zarażenie różnymi patogenami. Jednymi z nich są nicienie z rodziny *Anisakidae*, do których należą rodzaje *Anisakis* spp., *Contraecum*, *Pseudoterranova* i *Hysterothylacium*. Cykl rozwojowy *Anisakidae* jest złożony. Zapłodnione jaja wraz z kałem żywiciela ostatecznego dostają się do wody. Po 20–27 dniach wylęgają się larwy pierwszego stadium L1. Larwy te są inwazyjne dla pierwszego żywiciela pośredniego, którymi są skorupiaki morskie. Po przejściu wylinki w ciele pierwszego żywiciela pośredniego larwy L1 przekształcają się w stadium L2, które są zdolne do zarażenia drugiego żywiciela pośredniego – ryb morskich. W jamie ciała ryby larwy L2 przechodzą kolejną wylinkę i przekształcają się w stadium larwalne L3, które umiejscawia się pod błoną otrzewnową, na powierzchni gonad lub w wątrobie ryb. Żywiciele ostateczni, którymi są ssaki morskie, zarażają się, spożywając ryby zawierające larwy

w stadium L3. Pod błoną śluzową żołądka żywiciela ostatecznego dochodzi do kolejnego linienia i rozwoju larw L4, następna wylinka prowadzi do rozwoju form dojrzałych Anisakidae, które pasożytują w żołądku i jelicie ssaków morskich. Nicienie te charakteryzują się wydłużonym, nitkowatym kształtem ciała o średnicy około 1–2 mm i długości od 15 do 70 mm. Pokrywająca je kutikula zapewnia im odporność na niekorzystne warunki panujące w środowisku przewodu pokarmowego. W cyklu rozwojowym tych pasożytów mogą także występować żywicieli parateniczni – m.in. inne ryby lub człowiek (2, 3).

Spożywanie produktów rybnych surowych lub poddanych niedostatecznej obróbce termicznej, zawierających żywe larwy L3 może spowodować u ludzi chorobę zwaną anisakidozą. Zoonoza ta spowodowana jest wnikaniem larw nicieni do ścian przewodu pokarmowego. Występuje ona w postaci gardłowej, jelitowej, żołądkowej, a także zlokalizowanej w narządach poza przewodem pokarmowym. Nieleczona anisakidoza może przybrać postać przewlekłą, przypominającą chorobę wrzodową. Odpowiednia obróbka termiczna ryb i produktów rybnych inaktywuje pasożyty, jednak nie gwarantuje całkowitego bezpieczeństwa dla konsumentów. Martwe larwy Anisakidae nie mogą wywołać czynnej anisakidozy, jednak zawierają silne alergeny, będące przyczyną reakcji alergicznych u ludzi, często mylonych z alergią na mięso ryb (4, 5). Ryzyko zarażenia się czy też wystąpienia alergii wiąże się nie tylko ze spożywaniem mięsa ryb, ale także produktów rybnych, np. wątróbek dorszowych mogących zawierać larwy Anisakidae (4, 5).

Ocena ryzykowa niestety bywa niewystarczająca do rozpoznania, czy dana partia wątrób zawiera larwy Anisakidae. Zgodnie z obowiązującym prawodawstwem UE sposób postępowania z produktami rybołówstwa określa rozporządzenie (WE) nr 854/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 29 kwietnia 2004 r. (6). Oprócz wyżej wymienionego rozporządzenia istnieje również krajowy akt prawny, a mianowicie rozporządzenie ministra rolnictwa i rozwoju wsi z 24 maja 2004 r. w sprawie wymagań weterynaryjnych przy produkcji i dla produktów rybołówstwa (Dz.U. z 9 czerwca 2004 r.; 7). Przedstawia ono sposób postępowania z rybami i produktami z ryb w celu wykrycia i usunięcia pasożytów. Powyższe przepisy dotyczą jednak tylko pasożytów zewnętrznych. Nie sposób zatem odnosić się do nich przy badaniu ryb na obecność pasożytów wewnętrznych, tym bardziej, że nie jest możliwe przebadanie każdej ryby osobno. W związku z powyższym, pomimo stosowania przepisów istnieje ryzyko zarażenia się ludzi, związane ze spożywaniem wątrób z dorszy. Należy podkreślić, że dane na temat występowania Anisakidae w wątróbach dorszy poławianych w Morzu Bałtyckim są ograniczone, najczęściej pozyskiwane na podstawie badań o niewielkiej skali lub przypadkowych doniesień (8). Skala zarażenia dorszy w Morzu Bałtyckim wciąż nie jest wystarczająco poznana, zwłaszcza w aspekcie nicieni występujących w ich wątróbach. Dlatego też celem badań było określenie ekstensywności zarażenia wątrób

dorszy poławianych w Morzu Bałtyckim nicieniami z rodziny Anisakidae.

Material i metody

Do badań nad obecnością nicieni Anisakidae pobierano wątroby z dorszy poławianych w Morzu Bałtyckim. Połowy ryb odbywały się w kwietniu 2016 r. i styczniu 2017 r., na obszarach ICES 24, 25, 26: Zatoła Gdańska, Rynna Słupska, obszar KołobrzESCO–Darłowski, Bornholm Północny, Bornholm Południowy, Szwecja. Odłowione dorsze poddawano ocenie organoleptycznej, a następnie podczas wykonywanej sekcji pobierano wątroby od każdej ryby. Próbkę wątrób (próbkę stanowiła wątroba w całości) ważono, a następnie poddawano ocenie wzrokowej w celu stwierdzenia obecności widocznych pasożytów. Następnie wątroby trawiono w sztucznym soku żołądkowym, w skład którego wchodziła woda o temperaturze 44–46°C – 1 l, kwas solny 25% – 8 ml, pepsyna o mocy 2000 FIP – 5 g. Każdą próbkę trawiono oddzielnie przez około 24 godziny, przyjmując proporcję masy próbki (g) do objętości roztworu trawiącego (ml) 1:10. Po wytrawieniu próbki płyn przelewano przez sito o średnicy oczek 180 µm. Larwy pozostałe na sicie oceniano pod mikroskopem świetlnym (Nikon Eclipse E100) przy powiększeniu $\times 100$ i klasyfikowano do rodzaju/gatunku, na podstawie kształtu, długości całkowitej ciała, kształtu części ogonowej, kształtu części głowowej, obecności mukronu (3, 9, 10). Następnie larwy umieszczono w 70% alkoholu etylowym i przechowywano w temp. –20°C, do czasu analizy molekularnej.

Oznaczenie gatunku nicieni metodą PCR/RFLP wykonywano według protokołu EURLP (11). Pojedyncze larwy L3 poddawano izolacji genomowego DNA z użyciem komercyjnych zestawów do izolacji kwasów nukleinowych, „Tissue and Hair extraction kit” (Promega, USA) oraz DNA IQ system kit” (Promega, USA). Procedurę ekstrakcji DNA wykonywano wg instrukcji producenta zestawów. Reakcję PCR, podczas której amplifikowano fragment genomowego DNA obejmujący ITS-1 region, 5.8S gen, ITS-2 region oraz fragment genu 28S, przeprowadzono przy użyciu oligonukleotydów NC2 i NC5 (12). Produkty PCR poddawano rozdzielaniu elektroforetycznemu na 2% żelu agarozowym. Dodatkowo produkty poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi HinfI i HhaI (Thermo Scientific, Litwa). Otrzymane produkty cięcia enzymatycznego rozdzielano elektroforetycznie na 3% żelu agarozowym wysokiej rozdzielczości (Sigma Aldrich, USA), wybarwiano bromkiem etydy, a następnie odczytywano w świetle lampy UV translu-minatora. Jako markera użyto DNA GeneRuler 100bp (Fermentas EU; 13).

Wyniki

W latach 2016 i 2017 przebadano odpowiednio 508 i 848 wątrób dorszy. Uzyskane wyniki zebrano w **tabeli 1**. odsetek zarażonych ryb wynosił 37,5%. Średnia liczba larw w wątrobie u zarażonego dorsza w 2016 roku wynosiła 8,6 i była niższa niż w 2017 roku – 14,8. Zależność średniej liczby larw stwierdzonej

Tabela 1. Badania wątrób pochodzących od dorszy odłowionych w latach 2016–2017

| Data połowu | Liczba badanych wątrób | Liczba wątrób zarażonych | Odsetek próbek dodatnich | Łączna liczba wyizolowanych larw/ liczba średnia | Średnia długość ryby/ minimalna -maksymalna (cm) | Średnia masa ryby zarażonej/niezarażonej (g) | Średnia masa wątroby ryby zarażonej/niezarażonej (g) |
|---------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--|--|--|--|
| Kwiecień 2016 | 508 | 234 | 46 | 2018/8,6 | 37,5/21–70 | 627,8/485,8 | 32,4/27 |
| Styczeń 2017 | 848 | 318 | 37,5 | 4717/14,8 | 39,5/22–69 | 595,9/573,7 | 27/25,3 |
| Łącznie | 1356 | 552 | 40,7 | 6735/12,2 | 38,7/21–70 | 609,4/543,5 | 29,3/25,5 |

w wątróbach oraz długości i masy ryb przedstawiono na ryc. 1 i 2. Jak wynika z zamieszczonych na nich wykresów, istnieje zależność pomiędzy długością i masą ryb a liczbą larw nicieni stwierdzanych w ich wątróbach. Zauważyć można, że wzrostowi długości i masy ryb towarzyszy wzrost liczby larw izolowanych z ich wątrób. I tak u ryb o długości do 30 cm stwierdzano 16-krotnie mniej larw nicieni niż u ryb o długości 51–61 cm. Podobnie u zarażonych ryb o masie powyżej 1500 g liczba stwierdzanych larw była niemal 6-krotnie większa niż u ryb o masie do 500 g.

Następnie przeanalizowano występowanie larw nicieni w wątróbach dorszy pochodzących z poszczególnych obszarów połowowych. Wyniki przedstawiono w tabeli 2. Jak wynika z przedstawionych danych, stopień zapasożycenia ryb pochodzących z różnych obszarów połowowych nie był taki sam. W 2016 roku

największy odsetek zarażonych dorszy stwierdzono w obszarze Rynny Słupskiej, Bornholmu Południowego oraz Bornholmu Północnego (odpowiednio 56,2, 57 i 47,7%). Z kolei na obszarze połowowym KołobrzESCO–Darłowskim odsetek zarażenia był najniższy (23,9%).

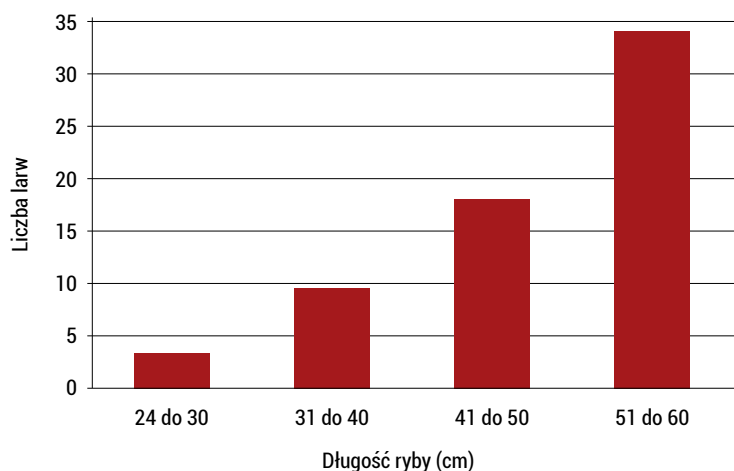
W 2017 r. najwyższy odsetek zarażonych wątrób zaobserwowano na obszarze Rynny Słupskiej (49,2%). Wysokie odsetki inwazji zaobserwowano na obszarach Bornholmu Północnego (43%) i KołobrzESCO–Darłowskim (43,7%). Najniższe odsetki zarażonych wątrób zaobserwowano u dorszy odłowionych z terenu obszarów połowowych Szwecji (22,4%) i Zatoki Gdańskiej (23,8%).

Na podstawie oceny cech morfologicznych podczas obserwacji mikroskopowej wyizolowane larwy nicieni zaklasyfikowano do rodzaju *Contraecum* (10). Badania molekularne przeprowadzone metodą PCR/RFLP potwierdziły, że pasożyty wyizolowane z wątrób pozyskanych od 551 dorszy, to larwy *C. osculatum*. W jednej wątrobie, pochodzącej od dorsza o długości 32 cm, masie 332 g, masie wątroby 20,4 g, pochodzącego z połowów w 2016 roku z rejonu Zatoki Gdańskiej, stwierdzono obecność jednego nicienia *A. simplex*.

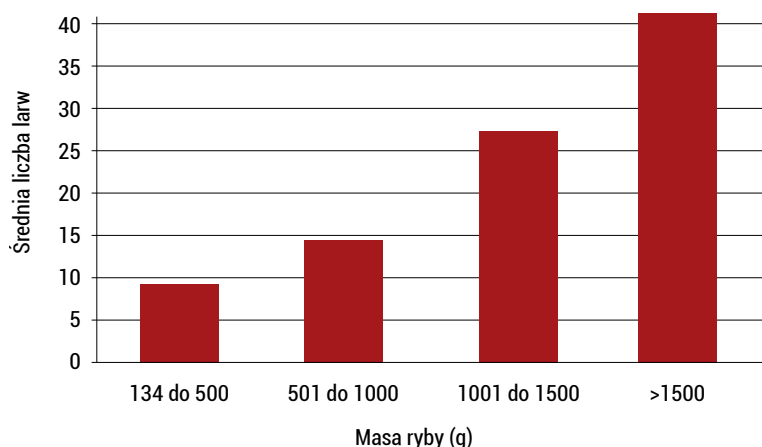
Omówienie

Wątroby z dorszy znane są z bogactwa kwasów tłuszczowych omega-3 oraz witamin A i D, które rzadko występują w innej żywności w tak dużej koncentracji jak w powyższym produkcie (14). Spożywanie wątróbek dorszowych oprócz zalet związanych z suplementacją w mikrośladniki może także wiązać się z niebezpieczeństwem biologicznym, jakim jest możliwość zarażenia się człowieka nicieniami z rodziny Anisakidae (5). W niniejszym artykule omówiono wyniki badań parazytologicznych wątrób od dorszy poławianych w Morzu Bałtyckim w latach 2016–2017. Łącznie do badań pozyskano 1356 dorszy. U 40,7% dorszy w wątróbach stwierdzono larwy nicieni z rodziny Anisakidae. Odsetek zarażonych ryb wahał się od 37,5 w 2017 r. do 46% w 2016 r., a średnia intensywność inwazji: 8,6 do 14,8 larwy.

Obserwacje na temat występowania nicieni z rodziny Anisakidae w wątróbach dorszy poławianych w Bałtyku nie są liczne. W ubiegłych latach podobne analizy w obszarach połowowych Bałtyku do badań własnych prowadzili m.in. Grabda (15), Haarder i wsp. (16), Myjak i wsp. (17), Mehrdana i wsp. (18) oraz Sokolova i wsp. (19). Autorzy ci stwierdzali występowanie nicieni z rodziny Anisakidae średnio w 2,5 do 100% badanych wątrób dorszy. Przy tak dużej rozpiętości wyników wyniki własne leżą więc niejako w środku



Ryc. 1. Średnia liczba larw stwierdzanych w wątróbach zarażonych ryb o różnej długości



Ryc. 2. Średnia liczba larw stwierdzanych w wątróbach zarażonych ryb w różnych przedziałach wagowych

Tabela 2. Wyniki badania wątrób pozyskanych od dorszy pochodzących z poszczególnych obszarów połowowych w 2016 i 2017 r.

| Obszar połowowy | Liczba badanych wątrób | | Liczba próbek dodatnich | | Odsetek zarażonych wątrób | | Łączna liczba larw | | Średnia liczba larw | |
|-----------------------|------------------------|------|-------------------------|------|---------------------------|------|--------------------|------|---------------------|------|
| | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 |
| Rynna Słupska | 146 | 130 | 82 | 64 | 56,2 | 49,2 | 821 | 1442 | 5,6 | 11,1 |
| Kołobrzsko-Darłowskie | 88 | 135 | 21 | 59 | 23,9 | 43,7 | 70 | 856 | 0,79 | 6,3 |
| Bornholm Południowy | 93 | 146 | 53 | 53 | 57,0 | 36,3 | 654 | 462 | 6,8 | 3,2 |
| Bornholm Północny | 65 | 146 | 31 | 75 | 47,7 | 43,0 | 161 | 1423 | 2,5 | 9,3 |
| Zatoka Gdańska | 116 | 126 | 47 | 30 | 40,5 | 23,8 | 312 | 336 | 2,7 | 2,7 |
| Szwecja | – | 165 | – | 37 | – | 22,4 | – | 198 | – | 1,3 |
| Łącznie | 508 | 848 | 234 | 318 | 46,0 | 37,5 | 2018 | 4717 | 8,6 | 14,8 |

powyższego przedziału. Duże różnice w obserwowanej przez poszczególnych autorów prevalencji mogą wynikać z okresów, w jakich prowadzono badania. Na przykład Haarder i wsp. (16) obserwowali znacznie niższą ekstensywność inwazji *C. osculatum* w wątróbach dorszy w latach 80. ubiegłego wieku (22% z 97 badanych wątrób) niż w 2012 r. (55,1% z 185 sztuk dorszy; 16). Grabda (15) w latach 70. ubiegłego wieku oceniała ekstensywność inwazji na 13,8%, a Sokolova (19) w latach 2016–2017 od 0 do 100% – w zależności od miejsca połowu. Zauważalna jest zatem pewna tendencja wzrostu ekstensywności inwazji na przestrzeni lat. Można tłumaczyć to wzrostem liczebności w Bałtyku populacji głównego żywiciela ostatecznego *C. osculatum* – foki szarej (*Halichoerus grypus*; 16) oraz stopniowym pogorszeniem kondycji populacji dorsza (8).

Należy sobie jednak zdawać sprawę z tego, że tak prosta zależność (wzrostu zarażenia ryb w ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat) nie jest do końca prawdziwa. Porównanie wyników uzyskanych przez różnych autorów nie jest łatwe, ponieważ uzyskiwane one były często w odmiennych warunkach. Między innymi dotyczyły różnych miejsc połowów. W badaniach własnych wykazano, że miejsce odłowu ma duży wpływ na prevalencję inwazji. I tak np. najwyższy odsetek zarażonych wątrób (56,2%) w 2016 r. stwierdzono w obszarze Rynny Słupskiej, a np. w obszarze Kołobrzsko-Darłowskim był on ponad dwukrotnie mniejszy. W kolejnym roku potwierdzono wysoką prevalencję pasożytów u ryb z Rynny Słupskiej, w obszarze Kołobrzsko-Darłowskim zaobserwowano jednak znaczny wzrost odsetka zarażonych ryb, a z kolei w Zatoce Gdańskiej nie mniej silny spadek. Także inni autorzy wykazywali znaczne różnice w zarażeniu ryb pochodzących z różnych obszarów połowowych. Na przykład Grabda (15) w 1976 r. stwierdzała największe odsetki zarażeń ryb nicieniami *C. osculatum* w obszarach Bornholmu Północnego (31,7–38%) i Bornholmu Południowego (26–34%) oraz na obszarze Kołobrzsko-Darłowskim (14,7–32,3%). Dane te są nieco niższe niż uzyskane w badaniach własnych. Myjak i wsp. (17) w latach 1987–1993 stwierdzali nicieniami w 3% wątrób dorszy odłowionych na obszarach połowowych Kołobrzsko-Darłowskim, Rynny Słupskiej i Bornholmu Południowego, a tylko 1,8% na obszarze Zatoki Gdańskiej. Uzyskanie tak niskich wyników można jednak tłumaczyć inną metodyką użytą do wykrywania nicieni (sekcja wątroby), co mogło być przyczyną niewykrywania

inwazji o niskiej intensywności. Z kolei Sokolova i wsp. (19) w swoich badaniach uzyskali na obszarze Bornholmu prevalencję na poziomie wyższym (100%) niż w naszych badaniach (43–57%). Analizując te dane, można stwierdzić, że uzyskiwane wyniki badań dotyczących obecności nicieni *C. osculatum* w wątróbach bałtyckich dorszy charakteryzują się dużą rozpiętością. Prevalencja inwazji oceniana przez różnych badaczy na tych samych obszarach różni się niekiedy kilkukrotnie. Połowy przeprowadzone we własnych badaniach w dwóch kolejnych latach dostarczyły wyników, które różniły się w niektórych przypadkach tych samych łowisk nawet 2-krotnie. Należy zaznaczyć, że lokalizacja łowisk nie była jedynym czynnikiem różnicującym połowy. Świadczy o tym fakt, że ryby pozyskane w tych samych łowiskach w kolejnych latach niekiedy znacznie różniły się wielkością. I tak np. w badaniach własnych średnia masa ryb niezarażonych w 2016 r. wynosiła 485,8 g, podczas gdy w 2017 r. – 573,7 g. Masa ryb może być zatem istotnym czynnikiem, na co wskazuje stwierdzone intensywniejsze zarażenie ryb cięższych i dłuższych. Wydaje się, że może mieć to związek z wiekiem dorszy, a co za tym idzie – większą możliwością ich zarażenia się. Na podobną zależność wskazują również badania Myjak i wsp. (17).

Należy podkreślić, że w badaniach własnych w większości badanych wątrób stwierdzono obecność larw z gatunku *C. osculatum* (99,82%). Gatunek ten jest najczęściej izolowany z wątrób dorszy i nazywany jest robakiem dorszowym (20). W badaniach własnych inwazję wątroby larwami *A. simplex* stwierdzono zaledwie u jednego dorsza (0,18%). Inni badacze także stwierdzali w wątróbach dorszy bałtyckich przede wszystkim *C. osculatum*, a inwazje *A. simplex* odnotowywali jedynie sporadycznie (15, 17). Mimo mniejszego potencjału zoonotycznego *C. osculatum*, w sytuacji gdzie stwierdza się duży odsetek wątrób dorszy zarażonych tymi nicieniami, mogą one stwarzać niebezpieczeństwo dla zdrowia ludzi. Wątroby dorszy poddawane są przed spożyciem obróbce termicznej, która co prawda powoduje inaktywację larw, jednak nie eliminuje wystąpienia reakcji alergicznej na antygeny *C. osculatum* (21, 22, 23).

Piśmiennictwo

1. <https://mir.gdynia.pl/bardzo-dobre-wyniki-polowowe-floty-baltyckiej-w-i-polowie-2018-r/>