

MORFOLOGICZNA I MOLEKULARNA ANALIZA ASCARIDOIDEA Z PÓŁNOCNEJ HOLARKTYKI

Katarzyna Najda

Niniejsza rozprawa doktorska stanowi zbiór publikacji przedstawiających wyniki badań nad Ascaridoidea (Nematoda: Chromadorea), według De Ley i Blaxter 2002, endopasożytami kręgowców, o dużym znaczeniu weterynaryjnym, medycznym i ekonomicznym. Nadrodzina ta obejmuje około 50 rodzajów, których przedstawiciele są szeroko rozpowszechnieni u swoich żywicieli pośrednich, paratenicznych i ostatecznych na obu półkulach. Ze względu na ich znaczenie jako czynników chorobotwórczych, relatywnie duże rozmiary i powszechne występowanie, przedstawiciele Ascaridoidea są jednymi z najczęściej badanych nicieni pasożytujących u kręgowców. Cechy budowy Ascaridoidea, szczególnie morfologiczne, wykazują znaczne zróżnicowanie wśród rodzajów i, w niektórych przypadkach, gatunków. Podobnie ich cykle życiowe różnią się między sobą. Jak większość pasożytów, nicienie z nadrodziny Ascaridoidea wykazują specyficzność względem żywicieli. W wodach Północnej Holarktyki spośród tej nadrodziny licznie notowane są nicienie z rodzin Anisakidae i Raphidascarididae, o dużym znaczeniu i skomplikowanych cyklach życiowych obejmujących wiele gatunków głowonogów, ryb, ptaków rybożernych i ssaków morskich.

Anisakidae dojrzałość płciową osiągają u zwierząt stałocieplnych (ssaków morskich i ptaków rybożernych), a Raphidascarididae głównie u ryb, najczęściej pasożytując w żołądku i jelitach. Cykl rozwojowy tych nicieni obejmuje pięć stadiów (L1–L4 oraz stadium dorosłe) rozdzielanych czterema linieniami. Jaja po zapłodnieniu wraz z kałem żywiciela ostatecznego wydostają się do wody. W otocze jajowej rozwijają się larwy L2 (lub u niektórych gatunków L3), które w środowisku morskim opuszczają jaja i zostają połknięte przez pierwszych żywicieli pośrednich – planktonowe i bentosowe zwierzęta bezkręgowce. *Pseudoterranova* spp. mają cykl życiowy związany z dnem, gdyż larwy gatunków z tego rodzaju nie są zdolne do pływania, w przeciwieństwie do larw w obrębie rodzaju *Anisakis* spp. i *Contracaecum* spp. W pierwszym żywicielu pośrednim, jeśli nie zaszło wcześniej, następuje linienie i larwy osiągają stadium L3, które jest inwazyjne dla kręgowców. Drugimi żywicielami pośrednimi lub paratenicznymi są ryby (np. śledzie, makrele, łososie), które zarażają się zjadając skorupiaki z larwami. U ryb larwy L3 osiedlają się przeważnie na otrzewnej wyścielającej jamę ciała i pokrywającej położone w niej narządy (np. *A. simplex*), choć niektóre wykazują preferencje do osiedlania się w określonych narządach (np. *P. decipiens*). Larwy w tej postaci są inwazyjne

dla żywicieli ostatecznych (gatunki rodzaju *Anisakis* dla waleni, *Pseudoterranova* dla płetwonogich, *Contracaecum* dla płetwonogich i ptaków rybożernych, *Hysterothylacium* dla ryb). Gdy larwa zostanie połknięta przez żywiciela ostatecznego rośnie i przechodzi linienie do stadium L4, a następnie osiąga dojrzałość płciową. W cyklu rozwojowym często występuje żywiciel parateniczny – ryby drapieżne (np. halibuty) i głowonogi, w ciele których gromadzą się duże liczby larw, nie ulegających jednak dalszemu rozwojowi.

Do rodziny Anisakidae należą gatunki o dużym znaczeniu gospodarczym. Pasożyty uszkadzają tkanki żywiciela i osłabiają go. Wpływając na kondycję organizmów stają się przyczyną chorób, szkód w hodowlach i strat ekonomicznych. Dużym problemem jest fakt, iż nicienie te obniżają wartość handlową mięsa rybiego. Przy masowym występowaniu pasożytów takie ryby nie nadają się do spożycia ze względów estetycznych, a często zmieniają również właściwości technologiczne surowca. Co więcej usuwanie pasożytów z ryb jest pracochłonne i pociąga za sobą dodatkowe koszty. Ponadto larwy gatunków należących do tej rodziny są chorobotwórcze dla ludzi spożywających surowe lub niedogotowane rybie mięso, wywołując zoonozę zwaną anisakidozą. Objawia się ona gorączką, bólami brzucha, nudnościami i wymiotami. Gatunki nicieni wywołujące tę chorobę należą do rodzajów: *Anisakis*, *Contracaecum* i *Pseudoterranova*, oraz, w mniejszym stopniu, z rodziny Raphidascarididae – *Hysterothylacium*. Poprzez zmieniające się preferencje żywieniowe (m.in. modę na sushi czy sashimi) anisakidoza występuje coraz liczniej, a dzięki stosowaniu lepszych metod diagnostycznych rozpoznawana jest coraz częściej. Jednak mimo tego wiele przypadków pozostaje nierozpoznanych, głównie ze względu na niespecyficzne objawy, jak biegunka, wymioty, mrowienie w gardle. Ponadto coraz liczniej opisywane są przypadki występowania alergii na larwy trzeciego stadium (L3) *Anisakis* spp. u ludzi po spożyciu prawidłowo przygotowanych ryb. Udowodniono, że alergeny larw z rodzaju *Anisakis* są termooporne i obróbka termiczna nie niszczy ich zdolności uczulających. Rozpoznanie anisakidozy utrudniają reakcje krzyżowe pomiędzy antygenami innych gatunków nicieni z rodzaju *Anisakis*, *Ascaris*, *Hysterothylacium*, *Toxocara*, *Trichinella*. Podstawą profilaktyki pojawiających się chorób odzwierzęcych jest opracowanie precyzyjnych (jednoznacznych) metod identyfikacji patogenów. Zanim dojdzie do zarażenia człowieka Anisakidae i Raphidascarididae występują one w organizmach będących żywicielami pośrednimi i paratenicznymi, stąd poznanie środowiska ich występowania i cykli rozwojowych jest warunkiem niezbędnym dla ochrony zdrowia ludzkiego. Poprzez poznanie mechanizmów inwazji w populacjach dzikich zwierząt będziemy w stanie lepiej przewidywać możliwe drogi zarażenia ludzi.

Systematyka nicieni oparta na cechach budowy morfologiczno–anatomicznej w ciągu ostatnich dziesięcioleci ulegała wielokrotnym zmianom. Powodem były trudności w obserwacji skomplikowanych cykli rozwojowych, problemy w doborze odpowiednich kryteriów i stosowanie wielu synonimicznych nazw. Ponadto wiele opisywanych osobników stanowiły stadia larwalne, które ciężko zidentyfikować ze względu na małą liczbę cech różnicujących i niewielkie rozmiary. Dopiero rozwój technik molekularnych – jak analiza allozymów czy DNA (PCR–RFLP, PCR–SSCP, sekwencjonowanie) – pozwolił na ujednoczenie podziału systematycznego nicieni. Odkryto, że wiele gatunków wcześniej opisanych tylko na podstawie cech morfologicznych stanowi całe kompleksy gatunków siostrzanych, które stanowią inne gatunki pod względem genetycznym i ekologicznym, a są praktycznie nierozróżnialne morfologicznie.

Ze względu na potencjalne zagrożenie chorobotwórcze Ascaridoidea dla ludzi, celem mojej pracy doktorskiej było zbadanie rozprzestrzenienia nicieni z tej nadrodziny. Badałam m.in. obecność Anisakidae u nerpy obrączkowanej (*Pusa hispida*) i fokowasa brodatego (*Erignathus barbatus*) z Zatoki Hudsona (Północna Kanada). Fokowate te, będąc żywicielami ostatecznymi dla *C. osculatum* sensu lato i *P. decipiens* sensu lato, odgrywają istotną rolę w transmisji ww. pasożytów do ryb, które z kolei są ważnym źródłem pożywienia dla Inuitów. W celu określenia ryzyka związanego ze spożywaniem przez rdzennych mieszkańców Północnej Kanady ich tradycyjnego pożywienia, starałam się określić skład gatunkowy, poziomu zarażenia i stadia rozwojowe pasożytów u badanych fokowatych.

Głównym zagadnieniem badawczym rozprawy doktorskiej było określenie składu gatunkowego nematofauny u badanych gatunków ryb i ssaków morskich oraz zbadanie dynamiki zarażenia (względne zagęszczenie, ekstensywność i intensywność zarażenia). Ponadto za cel przyjęto określenie korelacji między poziomem zarażenia a gatunkiem, wiekiem i płcią żywicieli. Kolejnym analizowanym zagadnieniem było badanie preferencji Ascaridoidea względem zajmowanych organów u ryb oraz różnic w zarażeniu w zależności od regionu i głębokości połowu. Gdzie było to możliwe badano również treść żołądków w celu określenia możliwych dróg zarażenia Ascaridoidea.

Wyniki uzyskane w ramach takiego zakresu pracy pozwalają na poznanie czynników wpływających na kondycję zdrowotną wybranych gatunków ryb i żywicieli ostatecznych, którzy to przyczyniają się do rozprzestrzeniania pasożytów w środowisku.

Materiał do moich badań pochodził z wód Północnej Holarktyki, a pozyskany został dzięki współpracy z wieloma instytucjami naukowymi. Pasożytnicze nicienie z halibuta grenlandzkiego [1] zebrane zostały przy współpracy Uniwersytetu Gdańskiego z Instytutem

Oceanologii Polskiej Akademii Nauk (IO PAN) podczas komercyjnego rejsu po Morzu Barentsa. Podczas kolejnego rejsu udało mi się, we współpracy z IO PAN oraz Fisheries Service under the Ministry of Agriculture Division of Fisheries research & science (Kłajpeda, Litwa), zebrać materiał parazytologiczny z ryb o dużym znaczeniu gospodarczym (m.in. halibut grenlandzki *Reinhardtius hippoglossoides*, dorsz atlantycki *Gadus morhua*, karmazyn *Sebastes mentella*, niegładzica *Hippoglossoides platessoides*) [5]. Dzięki kooperacji z Makivik Corporation (Kuujuaq, Kanada) możliwe było uzyskanie materiału z fokowatych (*Pusa hispida* i *Erignathus barbatus*) i białuchy arktycznej (*Delphinapterus leucas*) z Północnej Kanady [2, 4]. Dodatkowo pod względem parazytologicznym zbadane zostały ryby (*Cottocomphorus grewingkii* i *C. inermis*) z Jeziora Bajkał, pozyskane dzięki współpracy z Baikal Museum of Irkutsk Scientific Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Listvyanka, Rosja) [3].

W ramach niniejszej pracy pod kątem występowania pasożytniczych nicieni przebadano 243 ryby (z 5 gatunków) z Morza Barentsa izolując z nich 11122 osobniki Ascaridoidea [1, 5], z Zatoki Hudsona 7 fokowasów brodatych oraz 59 nerp obrączkowanych zarażonych odpowiednio 2650 oraz 94 nicieniami [2], z Jeziora Bajkał 88 *C. grewingkii* i 35 *C. inermis* zapasożyconych odpowiednio 84 i 51 Anisakidae [3] oraz z Północnej Kanady 13 białuch arktycznych, z których zebrano 190 nicieni [4].

W celu przygotowania materiału do oznaczeń nicienie były dzielone na 3 części. Do badań morfologiczno-anatomicznych wykorzystywano odcinek głowowy i ogonowy, które umieszczano w roztworze 70% alkoholu etylowego z dodatkiem 5% gliceryny, a po odparowaniu alkoholu prześwietlone nicienie analizowano przy użyciu mikroskopu świetlnego. Odcinek środkowy pasożyta przechowywano w 70% alkoholu etylowym do czasu analiz molekularnych.

Nicienie oznaczano do gatunku opierając się na budowie morfologiczno-anatomicznej. Zwracano uwagę m. in. na obecność zęba larwalnego, mukrona, spikuli, wyrostków żołądeczka i jelita, kształt żołądeczka i położenie otworu wydalniczego. Mając na uwadze to, że identyfikacja nicieni wyłącznie na podstawie różnic w budowie morfologicznej nie umożliwi rozpoznania gatunku siostrzanego w ramach kompleksu, zastosowano metody molekularne: analizę polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (PCR–RFLP) konserwatywnego fragmentu jądrowego rybosomalnego DNA (rDNA) obejmującego gen 5.8S i flankujące go sekwencje niekodujące (ITS1 i ITS2) oraz sekwencjonowanie. Technika PCR–RFLP została wybrana ze względu na jej szybkość oraz powszechność przy identyfikacji Ascaridoidea oraz stosunkowo niski koszt, a tym samym dużą liczbę dostępnych kluczy

molekularnych. Identyfikacja molekularna badanych przedstawicieli nadrodziny Ascaridoidea opierała się na porównaniu wzorów trawień enzymami restrykcyjnymi z dostępnymi kluczami molekularnymi bądź analizie sekwencji nukleotydowych z danymi z GenBank.

Przy użyciu mikroskopu świetlnego udało się zakwalifikować wyizolowane pasożyty do 4 kompleksów gatunków siostrzanych: *Anisakis simplex*, *Contracaecum osculatum*, *Pseudoterranova decipiens* oraz *Hysterothylacium aduncum*. Dopiero dzięki zastosowaniu technik molekularnych udało się wyodrębnić gatunki siostrzane. Wśród przebadanych żywicieli w Północnej Holarctyce odnotowano 7 gatunków: *Anisakis simplex* sensu stricto, *Contracaecum osculatum* A, *C. osculatum* B, *C. osculatum* C oraz *C. osculatum baicalensis*, *Pseudoterranova bulbosa* i *Hysterothylacium aduncum*. Największą ekstensywność zarażenia w badanej próbie wykazywały: *C. osculatum* sensu lato oraz *A. simplex* sensu lato.

W analizowanym materiale najwięcej, bo aż 84%, spośród badanych ryb z Morza Barentsa stanowił halibut grenlandzki [1, 5]. Gatunek ten został wybrany do analizy ze względu na to, że poławiany jest na skalę przemysłową i spożywany powszechnie w wielu państwach, a jako żywiciel Ascaridoidea może przyczyniać się do rozpowszechniania anisakidozy. U tej bentopelagicznej ryby dominującym pasożytem okazał się być *A. simplex* sensu stricto, który stanowił 84% wszystkich nicieni w materiale pobranym z halibuta w 2007 roku [1] oraz 73% w próbie z 2011 roku [5]. Drugim co do liczności był *Contracaecum osculatum* sensu lato (odpowiednio 15% i 21%), oprócz tego stwierdzono pojedyncze osobniki *H. aduncum* i *P. bulbosa*. Przeważająca większość nicieni znajdowała się w stadium larwalnym L3, z wyjątkiem *H. aduncum* w próbie z 2011 roku [5], gdzie notowano również L4 i osobniki dorosłe.

Spośród halibutów złowionych w 2007 roku [1] 98% było zarażonych Ascaridoidea. Zaobserwowano wzrost zapasożycenia halibutów wraz ze wzrostem długości ich ciała, co potwierdza dane literaturowe o akumulacji larw wraz z wiekiem ryby. Ze względu na rozmieszczenie prądów morskich w Morzu Barentsa próbę podzielono na 2 grupy: północną i południową. Zaobserwowano, że wymienione grupy różnią się znacząco w intensywności zarażenia halibuta *C. osculatum* sensu lato. Intensywność zarażenia w północnej grupie była wyższa niż w południowej, co sugeruje inne źródła pożywienia w badanych grupach. Ponadto odnotowano różne poziomy zarażenia Ascaridoidea w zależności od głębokości połowu. Ryby z płytkich wód (<610m) wykazywały wyższe zagęszczenie *A. simplex* sensu lato niż te z głębokich, natomiast w przypadku *C. osculatum* sensu lato trend był odwrotny. Spośród kompleksu *C. osculatum* oznaczono u halibuta grenlandzkiego 3 gatunki siostrzane: *C. osculatum* A, *C. osculatum* B oraz *C. osculatum* C, z czego ostatnie dwa gatunki odnotowano

po raz pierwszy u halibuta grenlandzkiego w Morzu Barentsa. Zaobserwowano mieszane zarażenie ryb oznaczonymi gatunkami *C. osculatum* sensu lato.

W trakcie kolejnych badań nematofauny z Morza Barentsa [5] poszerzono obszar badań: izolowano pasożytnicze nicienie z 5 gatunków ryb (halibuta grenlandzkiego, karmazyna, dorsza atlantyckiego, buławika siwego *Macrourus berglax* i niegładzicy) z uwzględnieniem miejsca występowania w ciele ryby. Nicienie izolowano ze ścian i światła żołądka, z jelit, wątroby, wyrostków pylorycznych i jamy ciała (w tym gonad i krezki). Przedstawiciele Ascaridoidea wykazywali różne preferencje co do zasiedlanych organów. *Anisakis simplex* sensu stricto, dominujący gatunek, znajdowany był w wątrobie, żołądka i jelitach w podobnych proporcjach (odpowiednio 29,5%, 29,1% i 28,6%). *Hysterothylacium aduncum* był najliczniej notowany w jelitach i żołądka (odpowiednio 45,3% i 38,1%) podczas gdy *C. osculatum* sensu lato wyraźnie preferował jelita (57,0%). Z kolei gatunek *P. bulbosa* najliczniej (45,5%) występował w wątrobie.

W ramach niniejszej pracy odnotowano różne zarażenie Ascaridoidea w zależności od gatunku ryby i miejsca jej życia [5]. Niegładzica, typowo bentosowy gatunek, charakteryzował się wysokim zapasożyceniem *P. bulbosa* w stosunku do bentopelagicznych ryb, jak dorsz atlantycki czy halibut grenlandzki. U wszystkich, poza niegładzicą, badanych ryb z Morza Barentsa dominującym nicieniem był *A. simplex* sensu stricto. Ponownie zaobserwowano różnice w zarażeniu Ascaridoidea pomiędzy próbami: północna vs południowa (podział powstały ze względu na rozmieszczenie prądów morskich w Morzu Barentsa) oraz wody płytkie vs głębokie dla wszystkich ryb. *Anisakis simplex* sensu stricto i *H. aduncum* wykazywały większe zarażenie w próbie z wód płytkich południowych, podczas gdy dla *P. bulbosa* notowano większe zarażenie w próbie z wód głębokich, północnych. Zagęszczenie *C. osculatum* sensu lato nie zmieniało się względem analizowanych prób. Dokonano analizy rozkładu gatunków kompleksu *C. osculatum* u halibuta grenlandzkiego w celu porównania do poprzednich wyników. Zaobserwowano występowanie *C. osculatum* A, B i C oraz 1 osobnika – hybrydy *C. osculatum* B i *C. osculatum* C.

Kolejnym badanym gatunkiem z kompleksu *C. osculatum* jest *C. osculatum baicalensis*, gatunek typowy dla Jeziora Bajkał. Badano rozprzestrzenienie tego gatunku u 2 gatunków ryb: *C. grewingkii* i *C. inermis*, będących drugimi żywicielami pośrednimi dla ww. nicienia [3]. Zaobserwowano wzrost intensywności zarażenia wraz z długością ryb oraz różnice w zarażeniu w stosunku do płci żywiciela.

Poza analizą nematofauny u żywicieli pośrednich i paratenicznych celowe było zbadanie stopnia zarażenia Ascaridoidea u żywicieli ostatecznych. W tym celu przebadano pod

kątem obecności Ascaridoidea żołądki nerp obrączkowanych i fokowasów brodatych z Arviat i Sanikiluaq (Zatoka Hudsona) oraz białuch arktycznych z Północnej Kanady, z rejonów gdzie do tej pory nie badano Ascaridoidea u białuch (wschodnia Zatoka Hudsona i Cieśnina Hudsona). U fokowatych odnotowano 3 gatunki pasożytów: *P. bulbosa* oraz *C. osculatum* A i C, natomiast u białuch: *A. simplex* sensu stricto, *P. bulbosa* oraz *C. osculatum* A i C. Zauważono znacząco większą intensywność zarażenia u fokowasów brodatych w stosunku do nerp obrączkowanych (odpowiednio 379 vs 5 egzemplarzy). Zaobserwowano również preferencje nicieni względem żywiciela u badanych fokowatych, związane z ich preferencjami żywieniowymi i trybem życia. U fokowasa brodatego 100% osobników zarażonych było *P. decipiens* sensu lato, podczas gdy u nerpy obrączkowanej dominował *C. osculatum* sensu lato. Dla obu gatunków zaobserwowano przewagę nicieni dorosłych nad L4 oraz samic nad samcami. Za duży sukces podczas realizacji pracy doktorskiej uznać można odkrycie *C. osculatum* A i C w Zatoce Hudsona, do tej pory tam nie notowanych [2].

Wśród badanych białuch arktycznych największą ekstensywność i intensywność zarażenia odnotowano dla *P. decipiens* sensu lato, a najniższą dla *A. simplex* sensu lato, mimo że uchodzi on za gatunek typowy dla waleni. Spowodowane to mogło być faktem dużej liczebności fokowatych w tym regionie, które mogły transmitować poprzez łańcuch troficzny specyficzne dla nich pasożyty (jak *P. decipiens* sensu lato) do białuch. Wyizolowane nicienie reprezentowały 3 stadia rozwojowe: L3 (dominujące), L4 oraz dorosłe (z większym udziałem samców niż samic). Co ciekawe L4 i osobniki dorosłe notowano tylko dla *P. decipiens* sensu lato, co świadczy o tym, że białucha arktyczna jest dla tego gatunku żywicielem ostatecznym. Jest to prawdopodobnie związane z preferencjami żywieniowymi białuch, które odżywiają się m.in. bentosowymi rybami i bezkręgowcami, które notowane są jako żywiele pośredni rodzaju *Pseudoterranova*. Potwierdzają to również niniejsze badania, podczas których w żołądkach białuch arktycznych znaleziono twarde elementy pancerzy bezkręgowców, jak szczęki nereidy czy dzioby kałamarnic [4].

Uzyskane wyniki mogą wpływać na całokształt postrzegania rozprzestrzenienia i interakcji nicieni z ich środowiskiem życia, jakim są nie tylko żywiele ostateczni, ale także żywiele parateniczni oraz pośredni, wykazujący się określonymi preferencjami środowiskowymi oraz zasięgiem występowania. Nicienie z nadrodziny Ascaridoidea są szeroko rozpowszechnionymi pasożytami ryb, ssaków oraz ptaków rybożernych, występującymi również w strefach polarnych (Północny Atlantyk, Zatoka Hudsona, Morze Barentsa). Po raz pierwszy odnotowano gatunki spośród Ascaridoidea u nowych żywicieli w wymienionych akwenach [1, 2]. Uzyskana wiedza ma nie tylko ogólne znaczenie

biologiczne, ale również medyczne, gdyż wskazuje na stopień zapasożycenia gatunków będących pożywieniem ludzi, a potencjalnie niebezpiecznych ze względu na ryzyko anisakidozy [1-5].

Wyniki analiz dają pogląd na wielkość zarażenia gatunków ryb ważnych dla gospodarki. Dotychczasowym problemem jest tradycyjna identyfikacja *Ascaridoidea* oraz trudność w oznaczeniu stadiów larwalnych, które są w niewielkim stopniu zróżnicowane pomiędzy sobą morfologicznie i anatomicznie, a różnią się biologią i patogennością. Powyższe kwestie w niniejszej pracy są rozwiązane poprzez użycie technik molekularnych (PCR–RFLP, sekwencjonowanie).

Kolejne warte poruszenia zagadnienie to niejednakowe zarażenie ryb gatunkami siostrzanymi. Niniejsze badania pozwalają na precyzyjne określenie dynamiki zarażenia kryptogatunkami, dzięki czemu możliwe będzie uaktualnienie przepisów sanitarnych dotyczących monitoringu i metod badawczych surowca rybnego.

Zagadnienia poruszane podczas tworzenia dysertacji wpisują się również w sektor piąty gospodarki narodowej, do którego zaliczamy m.in. ochronę zdrowia. Rozprzestrzeniająca się moda na konsumpcję surowych ryb stwarza nieświadomione zagrożenia dla konsumentów. Od 1960 r. odnotowano ponad 34000 przypadków anisakidozy, z czego w Japonii rocznie notuje się ok. 2000 przypadków, a w Europie ok. 500. O zarażenie nie jest trudno, gdyż dla przykładu u dorsza międzynarodowy standard Codex Alimentarius toleruje zarobaczenie mięsa w sprzedaży do 5 nicieni w 1kg ryby. Szczegółowe poznanie parazytofauny i stopnia zarażenia badanych żywicieli pozwala na określenie gatunków, których spożywanie wiąże się z największym ryzykiem zachorowania na anisakidozę.