



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANA BİLİM DALI

TÜRKİYE’NİN EGE KIYILARINDA AVLANAN
LİPSOZ (*SCORPAENA SCROFA* LINNAEUS, 1758) BALIĞINI
ENFEKTE EDEN *ANISAKIS* TÜRLERİNİN (NEMATODA:
ANISAKIDAE) MOLEKÜLER TEŞHİSİ

Doktora Tezi

Coşkun AYDIN

Danışman
Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ

SAMSUN
2021

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK PARAZİTOLOJİSİ ANA BİLİM DALI



TÜRKİYE’NİN EGE KIYILARINDA AVLANAN
LİPSOZ (*SCORPAENA SCROFA* LINNAEUS, 1758) BALIĞINI
ENFEKTE EDEN *ANISAKIS* TÜRLERİNİN (NEMATODA:
ANISAKIDAE) MOLEKÜLER TEŞHİSİ

Doktora Tezi

Coşkun AYDIN

Danışman

Doç. Dr. Gökmez Zafer PEKMEZCİ

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.19.005 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Coşkun AYDIN tarafından, Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ danışmanlığında hazırlanan “Türkiye’nin Ege Kıyılarında Avlanan Lipsoz (*Scorpaena scrofa* Linnaeus, 1758) Balğımı Enfekte Eden *Anisakis* Türlerinin (Nematoda; Anisakidae) Moleküler Teşhisi” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 8.7.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Şinasi UMUR Ondokuz Mayıs Üniversitesi Parazitoloji Ana Bilim Dalı (Veteriner)		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Semih ÖGE Ankara Üniversitesi Parazitoloji Ana Bilim Dalı (Veteriner)		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Alparslan YILDIRIM Erciyes Üniversitesi Parazitoloji Ana Bilim Dalı (Veteriner)		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye	Prof. Dr. Ertan Emek ONUK Ondokuz Mayıs Üniversitesi Su Ürünleri Hastalıkları Ana Bilim Dalı (Veteriner)		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret
Üye (Danışman)	Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Su Ürünleri Hastalıkları Anabilim Dalı (Veteriner)		<input type="checkbox"/> Kabul <input type="checkbox"/> Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza

11/06/2021

Coşkun AYDIN

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Türkiye'nin Ege Kıyılarında Avlanan Lipsoz (*Scorpaena scrofa* Linnaeus, 1758) Balığını Enfekte Eden *Anisakis* Türlerinin (Nematoda; Anisakidae) Moleküler Teşhisi

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 11/06/2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 13

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

İmza

11 /06/2021

Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ

ÖZET

TÜRKİYE’NİN EGE KIYILARINDA AVLANAN LİPSOZ (*SCOPAENA SCROFA* LINNAEUS, 1758) BALIĞINI ENFEKTE EDEN *ANISAKIS* TÜRLERİNİN (NEMATODA: ANISAKIDAE) MOLEKÜLER TEŞHİSİ

Coşkun AYDIN

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Veterinerlik Parazitolojisi Ana Bilim Dalı

Doktora, Temmuz/2021

Danışman: Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ

Bugüne kadar Türkiye karasularında avlanan ticari değeri yüksek olan lipsoz (*Scorpaena scrofa* Linnaeus, 1758) balıklarının enfekte eden *Anisakis* (Nematoda: Anisakidae) türlerinin varlığı hakkında herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Bu çalışmada ilk kez Ege Denizi kıyılarında avlanan lipsoz balıklarında *Anisakis* larvalarının enfeksiyon oranı, yoğunluğu ve bolluğunun araştırılması ile larvaların moleküler olarak tür düzeyinde identifikasyonlarının yapılması amaçlanmıştır.

Ege Denizi’nde (FAO 37.3.1) avlanan 272 lipsoz balığı parazitolojik yönden incelenmiştir. Lipsozlardan nematod larvaları toplanmış, sayılmış ve larvaların morfolojik identifikasyonları yapılmıştır. Sonrasında identifiye edilen *Anisakis* larvaların rDNA ITS gen bölgesi PZR ile çoğaltılmış ve *Hha* I ile *Hinf* I enzimleri kullanılarak RFLP analizleri yapılmıştır. RFLP ile tür teşhisleri yapılan bazı *Anisakis* larvaların mtDNA *cox 2* gen bölgeleri çoğaltılmış ve DNA dizi analizleri ile tür doğrulamaları yapılmıştır.

Sonuç olarak 272 lipsoz’un 26’sı *Anisakis* spp. larvaları ile enfekte bulunmuş ve enfeksiyon oranı %9,6 olarak belirlenmiştir. *Anisakis* spp. larvalarının enfeksiyon yoğunluğu 2,8 (1–21 larva) ve enfeksiyon bolluğu 0,2 olarak saptanmıştır. Lipsozlardan toplam 74 *Anisakis* spp. larvası karın boşluğu, iç organlarının yüzeyi ve mezenteriyumdan toplanmıştır. Lipsozların kas dokularında *Anisakis* spp. larvaları bulunmamıştır. Lipsoz balıklarında ilk kez *Anisakis pegreffii*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip ve *A. ziphidarum* türleri moleküler olarak identifiye edilmiştir. Bu araştırma ile ülkemiz karasularında ilk kez *A. ziphidarum* rapor edilmiştir. Bunun yanında lipsoz türünün *A. ziphidarum*, *A. typica* ve *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip için yeni bir ara/paratenik konak olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak lipsozlarda zoonoz karakterli *A. pegreffii* varlığı halk sağlığı açısından tüketicilere risk oluşturabilir. Ayrıca, tüketicilerde *Anisakis pegreffii* ile enfekte lipsozların tüketilmesi sonucunda parazitik alerji gelişebilir. Bu çalışmanın sonuçları yetkililerin gıda güvenliği için *Anisakis*'e bağlı alerji riskini azaltmak için HACCP programını yeniden düzenlemelerinde önemli bir etkiye sahip olacaktır.

Anahtar Sözcükler: *Anisakis* spp., RFLP, DNA dizi analizi, *Scorpaena scrofa*, Ege Denizi

ABSTRACT

MOLECULAR IDENTIFICATION OF *ANISAKIS* SPECIES (NEMATODA: ANISAKIDAE) INFECTING RED SCORPIONFISH (*SCOPAENA SCROFA* LINNAEUS, 1758) CAUGHT IN THE AEGEAN COASTS OF TURKEY

Coskun AYDIN

Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Parasitology
Ph.D. thesis, July/2021

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gokmen Zafer PEKMEZCI

To date, no research has been conducted on the presence of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) that infect high commercial value red scorpionfish *Scorpaena scrofa* (Linnaeus, 1758) caught in Turkish marine waters. Therefore, it was aimed to investigate the prevalence, mean intensity, and mean abundance of *Anisakis* larvae, and to molecularly identify the larvae at species level in red scorpionfish caught in the Aegean Sea coasts of Turkey for the first time in the present study.

Parasitological examination of 272 red scorpionfish caught in the Aegean Sea (FAO 37.3.1) were performed. Nematode larvae were collected, counted, and morphological identification of larvae was made. Subsequently, the rDNA ITS gene region of identified *Anisakis* larvae was amplified by PCR, and RFLP analysis was performed using *Hha* I and *Hinf* I restriction enzymes. The mtDNA *cox 2* of some *Anisakis* larvae identified to species level with RFLP were amplified, and species confirmation was also carried out by DNA sequencing.

As a result, twenty-six of 272 red scorpionfish were infected with *Anisakis* spp. larvae and their prevalence was determined as 9.6%. Mean intensity and mean abundance of *Anisakis* spp. larvae were 2.8 (1–21 larvae) and 0.2, respectively. A total of 74 *Anisakis* larvae were collected from the abdominal cavity, viscera, and mesenteries. No *Anisakis* larvae were found in the muscle of red scorpionfish. *Anisakis pegreffii*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hybrid genotype, and *A. ziphidarum* were molecularly identified in the red scorpionfish for the first time. This is the first report of *A. ziphidarum* from Turkish marine waters. Moreover, the present study indicates red scorpionfish as a new intermediate/paratenic host records for *A. typica*, *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hybrid genotype, and *A. ziphidarum*.

In conclusion the presence of zoonotic *A. pegreffii* in red scorpionfish may present a health risk for consumers. Furthermore, consumers may develop parasitic allergies due to consuming red scorpionfish infected with *Anisakis pegreffii*. The results of this research will have a significant impact for authorized people to reorganize the HACCP program to reduce the risk of allergies depends on *Anisakis* for food safety.

Keywords: *Anisakis* spp., RFLP, DNA sequencing, *Scorpaena scrofa*, Aegean Sea

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince ilgi ve desteğini esirgemeyen, tez konusunun seçilmesinde ve çalışmaların yürütülmesinde büyük katkısını gördüğüm tez danışmanım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Gökmen Zafer PEKMEZCİ'ye, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Şinasi UMUR'a ve değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Mustafa AÇICI'ya, Doç. Dr. Cenk Soner BÖLÜKBAŞ'a, Doç. Dr. Ali Tümay GÜRLER'e, Araş. Görevlisi Elif Burcu GENÇAY TOPÇU'ya, Doktora Öğrencisi Veteriner Hekim Öykü BARILI'ya ve Yüksek Lisans öğrencisi Veteriner Hekim Tuğçe TUYGUN'a çok teşekkür ederim.

Enstitüde göreve başladığım günden itibaren desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen bir baba gibi varlığını her zaman hissettiren Samsun Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürü Sayın Uzman Veteriner Hekim İsmail AYDIN'a, Enstitü Müdür Yardımcımız Sayın Sezai CİBELİK'e, Enstitü İdari Koordinatörümüz Veteriner Hekim Sayın Ahu KAYALARLI ACARTÜRK'e, Parazitoloji Laboratuvarı ve Arı Hastalıkları Laboratuvarında çalışmaya başladığım günden itibaren bütün bilgisi ve tecrübelerini aktaran, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Parazitoloji Laboratuvarı Sorumlusu Sayın Dr. Selma KAYA'ya, Arı Hastalıkları Laboratuvarı Sorumlusu Sayın Dr. Rahşan AKPINAR'a, mesai arkadaşlarım Sayın Veteriner Hekim Sema Nur ÇELİK'e, Veteriner Hekim Şakir Önder TÜRLEK'e, Veteriner Sağlık Teknikeri Gökhan GÜVEN'e, Veteriner Sağlık Teknikeri Murat YALDIZ'a ve Veteriner Sağlık Teknikeri Bilal KÜÇÜKOĞLU'na, çalışmalarım sonrasında laboratuvarımızda her zaman temiz bir ortam sağlam Sayın Ali ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim. Balık hastalıkları konusunda bilgisini her zaman paylaşan Enstitümüz Balık Hastalıkları Laboratuvarı Sorumlusu Sayın Dr. Yüksel DURMAZ'a çok teşekkür ederim.

Tez araştırma konum için uykusunu yarıda kesip ve hiçbir karşılık beklemeden taze balık örneklerini İzmir Balık Hali'nden gönderen değerli meslektaşım Sayın Veteriner Hekim Burak YAVAŞ'a çok teşekkür ederim.

Gerek Veteriner Fakültesi'nde okuduğum yıllarda gerekse meslek hayatımda

her zaman bana destek olan değerli hocalarım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Ayşe ÇAKMAK'a ve Anatomi Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR'a çok teşekkür ederim.

Tez yazım süresince çeviri kısmında zorlandığım anda yardımını eksik etmeyen dayımın kızı, canım kardeşim İngilizce Öğretmeni Sayın Duygu BAYRAKTAROĞLU'na çok teşekkür ederim.

Son olarak manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem Emine AYDIN'a, değerli eşim Tünay AYDIN'a, kızlarım Fatma Yağmur AYDIN'a, Elif Nehir AYDIN'a ve bu dünyada olmasa da varlığını her zaman hissettiğim rahmetli babam İsmail AYDIN'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.19.005 proje numarası ile desteklenmiştir.

Coşkun AYDIN

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ	
	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	
2.	GENEL BİLGİLER	3
2.1.	Anisakidae Ailesindeki Nematodlar Hakkında Genel Bilgiler.....	6
2.2.	Ülkemiz Karasularında Avlanan ve İthal Edilen Deniz Balıklarındaki <i>Anisakis</i> Türlerinin Moleküler İdentifikasyonu.....	19
2.3.	Lipsoz Balığı Hakkında Genel Bilgiler	21
3.	MATERYAL VE METOT	24
3.1.	Materyal	24
3.2.	Metot	25
3.2.1.	Lipsoz Balıklarının Parazitolojik Muayenesi	25
3.2.2.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının Morfolojik İdentifikasyonu	27
3.2.3.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının Enfeksiyon Parametreleri	28
3.2.4.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının Genomik DNA İzolasyonu	28
3.2.5.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının ITS Gen Bölgesinin PZR Analizleri.....	28
3.2.6.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının RFLP Analizleri	29
3.2.7.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının <i>Cox 2</i> Gen Bölgesinin PZR Analizleri	29
3.2.8.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının <i>Cox 2</i> Gen Bölgesinin DNA Dizi ve Filogenetik Analizleri	30
4.	BULGULAR	32
4.1.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının Morfolojisi ve Enfeksiyon Parametreleri	32
4.2.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının ITS Gen Bölgesinin PZR ve RFLP Sonuçları.....	39
4.3.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının <i>Cox 2</i> Gen Bölgesinin PCR ve DNA Dizi Analiz Sonuçları	41
4.4.	<i>Anisakis</i> spp. Larvalarının <i>Cox 2</i> Gen Bölgesinin Filogenetik Analizleri	42
5.	TARTIŞMA	51
6.	SONUÇ	56
	KAYNAKLAR	57
	ÖZ GEÇMİŞ	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromol
AIC	: Akaike Information Criterion
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
cox2	: Cytochrome C oxidase subunit 2
dk	: Dakika
DHA	: Docosahexaenoic acid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPA	: Eicosapentaenoic acid
FAO	: Food and Agriculture Organization – Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü
G+I	: Gamma Distributed with Invariant Sites
gDNA	: Genomik DNA
gr	: Gram
HACCP	: Hazard Analysis and Critical Control Point – Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları
HKY	: Hasegawa-Kishino-Yano
ITS	: Internal Transcribed Spacer
kg	: Kilogram
L1	: Birinci dönem larva
L2	: İkinci dönem larva
L3	: Üçüncü dönem larva
L4	: Dördüncü dönem larva
ML	: Maximum Likelihood
m	: Metre
mm	: Milimetre
mtDNA	: Mitochondrial DNA
n	: Örnek sayısı

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rDNA : Ribosomal DNA
rrnS : Small subunit of ribosomal RNA
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
UV : Ultraviyole
V : Volt



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Anisakis</i> (□), <i>Pseudoterranova</i> (Δ), <i>Contracaecum</i> (○) ve <i>Phocascaris</i> (*) türlerinin dağılım alanlarını gösteren dünya haritası.....	6
Şekil 2.2. Farklı coğrafik avlanma alanlarına göre <i>Anisakis</i> spp. türlerinin dağılımı ve oranları.....	7
Şekil 2.3. Balıklarda sıklıkla görülen ve potansiyel olarak anisakiosise neden olabilen nematodların üçüncü evre larvaları (L3) arasındaki farklı morfolojik özellikler.....	9
Şekil 2.4. <i>Anisakis</i> türleri arasındaki filogenetik ilişkiler.	12
Şekil 2.5. <i>Anisakis</i> spp. ve deniz memelilerinin filogenetik ilişkisi.....	14
Şekil 2.6. <i>Anisakis</i> spp.'nin yaşam döngüsü.....	14
Şekil 2.7. <i>Anisakis</i> türlerinin yaşam döngüsü ve zoonotik rolleri	15
Şekil 2.8. <i>Scorpaena scrofa</i> (L.) türünün genel görünüşü.....	22
Şekil 2.9. <i>Scorpaena scrofa</i> (L.) türünün coğrafik dağılımı	23
Şekil 3.1. Balık tezgahlarında satışa sunulan lipsoz balığı <i>Scorpaena scrofa</i> (L.).....	24
Şekil 3.2. Lipsoz balığı <i>Scorpaena scrofa</i> (L.).....	25
Şekil 3.3. Lipsozların nekropsi ve parazitolojik muayenesi.....	26
Şekil 3.4. Lipsoz balıklarından nematod larvalarının toplanması.....	26
Şekil 3.5. Lipsoz balıklarının kas dokularının nematod larvaları yönünden muayenesi.....	27
Şekil 4.1. Lipsoz balığının karın boşluğundaki <i>Anisakis</i> spp. larvaları (a).....	33
Şekil 4.2. Lipsoz balığının karın boşluğundaki <i>Anisakis</i> spp. larvaları (b).....	34
Şekil 4.3. Lipsoz balığının mezenteriyumundaki <i>Anisakis</i> spp. larva topluluğu	34
Şekil 4.4. <i>Anisakis</i> tip I larva (üçüncü dönem) ön parça.....	35
Şekil 4.5. <i>Anisakis</i> tip I larva (üçüncü dönem) ön uç.....	36
Şekil 4.6. <i>Anisakis</i> tip I larva (üçüncü dönem) ventrikül bölgesi.....	37
Şekil 4.7. <i>Anisakis</i> tip I larva (üçüncü dönem) arka uç.....	38
Şekil 4.8. ITS gen bölgesinin <i>Hinf</i> I (A) ve <i>Hha</i> I (B) enzimleri ile kesildiğinde elde edilen DNA bant profilleri.....	40
Şekil 4.9. <i>Anisakis ziphidarum</i> izolatlarının (28, 39, 45, 47) <i>cox 2</i> genleri arasındaki nükleotid farklılıkları.....	43
Şekil 4.10. <i>Anisakis typica</i> izolatlarının (16, 17, 27) <i>cox 2</i> genleri arasındaki nükleotid farklılıkları.....	44
Şekil 4.11. <i>A. simplex</i> (s.s.) x <i>A. pegreffii</i> hibrit genotipin izolatlarının (34, 37, 40) <i>cox 2</i> genleri arasındaki nükleotid farklılıkları.....	45
Şekil 4.12. <i>Anisakis pegreffii</i> izolatlarının (30, 56) <i>cox 2</i> genleri arasındaki nükleotid farklılıkları.....	46

Şekil 4.13. *Anisakis* spp. türlerinin *cox 2* gen bölgesi ML analizlerine göre filogenetik ilişkileri50



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 4.1. <i>Anisakis</i> türlerinin <i>cox 2</i> gen bölgelerinin GenBank erişim numaraları.....	41
Tablo 4.2. <i>Anisakis</i> türlerinin <i>cox 2</i> gen bölgesinin genetik uzaklıkları (%).....	48



1. GİRİŞ

Gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından zoonoz balık parazitleri arasında özellikle nematodlar içinde Anisakidae ailesinde yer alan parazit türleri önem arz etmektedir. Anisakidae ailesinde *Anisakis*, *Pseudoterranova* ve *Contracaecum* cinsi içerisinde yer alan türler özellikle deniz balıklarının tüketilmesi sonucunda insanlarda gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından sorunlara neden olabilmektedir.

Lipsoz (*Scorpaena scrofa* Linnaeus, 1758) ya da diğer adı ile Adabeyi Scorpaenidae ailesinde yer alan ticari değeri oldukça yüksek ve eti lezzetli olan kemikli bir balık türüdür. Ülkemiz karasularından Marmara Denizi, Akdeniz ve Ege Denizi'nde bulunmaktadır. Bu balık türünün sıklıkla ızgarası, kavurması, buğulaması ve çorbası yapılmaktadır.

Bugüne kadar lipsoz türünü enfekte eden *Anisakis* türlerinin moleküler identifikasyonu ve *Anisakis* larvalarının epidemiyolojik parametrelerinin (enfeksiyon oranı, enfeksiyon yoğunluğu, enfeksiyon bolluğu) ortaya çıkarılması için az sayıda kapsamlı araştırma yapılmıştır (Abollo, et al., 2001). Bu araştırmada (Abollo, et al., 2001) İspanya'nın Atlantik Okyanusu kıyılarında avlanan lipsozlarda *A. pegreffii* ve *A. simplex* (s.s.) türleri moleküler olarak identifiye edilmiştir. Ege Denizi'nde yaşayan, ticari değeri oldukça yüksek olan ve tüketiciler tarafından sevilerek tüketilen lipsozları enfekte eden *Anisakis* larvalarının varlığı, enfeksiyon oranları, yoğunluğu, bolluğu ile lipsozların hangi *Anisakis* türleri ile enfekte olduğu bilinmemektedir. Bu doktora tezinde ilk kez Ege Denizi kıyılarında avlanıp insan tüketimine sunulan lipsozlarda *Anisakis* larvalarının epidemiyolojik parametrelerinin belirlenmesi ve moleküler olarak identifiye edilmesi amaçlanmıştır.

Ülkemiz Ege Denizi kıyılarında (FAO 37.3.1) avlanıp insan tüketimine sunulan lipsoz balıklarında ilk kez *Anisakis* larvalarının varlığı ile enfeksiyon oranları, yoğunluğu ve bolluğu araştırılmış ve tespit edilen larvaların RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve DNA dizi analizleri ile moleküler olarak tür teşhisleri yapılmıştır.

Lipsozlarda ilk kez *Anisakis pegreffii*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hibrit genotip ve *A. ziphidarum* türleri moleküler olarak identifiye edilmiştir. Bu araştırma ile ülkemiz karasularında avlanan deniz balıklarında ilk kez *A. ziphidarum* türü rapor edilmiştir. Bununla birlikte lipsoz türünün *A. ziphidarum*, *A. typica* ve *A.*

simplex (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip için yeni bir ara/paratenik konak olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez araştırması ülkemizde Ege Denizi kıyılarında avlanıp insan tüketimine sunulan lipsoz balıklarında HACCP sistemi ve halk sağlığı açısından zoonoz *Anisakis* türlerinin moleküler tanısı ve enfeksiyon parametrelerinin ortaya konulması açısından kapsamlı ve güncel ilk verileri içermektedir.



2. GENEL BİLGİLER

Hızlı nüfus artışının yaşandığı ülkemizde ve dünyada gıda kaynaklarının en iyi şekilde değerlendirilmesi ve üretilen ürünlerin güvenilir olması gerekmektedir. İnsanların sağlıklı ve dengeli beslenmesinde hayvansal kökenli protein kaynakları büyük önem taşımaktadır. Nüfus artışı, besin kaynaklarının azalması ve bilinçsiz kullanımı ve üretiminde yaşanan sıkıntılar sonucu protein kaynaklarının önemli bir kısmını oluşturan et ve süt ürünleri yetersiz kalmaktadır. Bu durumda doymamış yağ asitlerince (EPA, DHA, Omega-3, 6, 9) zengin, yapısında birçok vitamin (A, D, E, B1, B2, B3, B6, B12) ve mineral (iyot, selenyum, çinko, fosfor, magnezyum) barındıran, düşük enerji değerine sahip, sindirimi kolay, sağlıklı ve ucuz bir protein kaynağı olan balık eti popüler bir ürün hale gelmiştir. Özellikle gelişmiş ülkelerin çoğu su ürünleri tüketimine yönelmişlerdir. İnsan sağlığı açısından bu kadar önemli olan ve hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında büyük paya sahip olan deniz ve tatlı su ürünleri aynı zamanda riskli gıdalar listesinde yer almaktadır (Şimşek ve Yılmaz, 2016).

İnsan nüfusuna paralel olarak artan gıda ihtiyacını karşılamak üzere gıda endüstrisindeki hızlı gelişmeler tüketiciye çeşitli olanaklar sunarken daha kaliteli, güvenli ve sağlıklı gıda üretiminin zorunluluğunu da beraberinde getirmektedir. Özellikle son yıllarda tüketicinin daha kaliteli et olması, kolay sindirilmesi, diyetik özelliği olması açısından balık ve balıkçılık ürünlerine olan ilgisinin giderek artmasıyla birlikte sektörde çalışan ve bu ürünleri tüketen insanlarda zoonoz hastalıklar başta olmak üzere halk sağlığını tehdit eder boyutlarda ciddi sorunlar yaşanmaya başlanmıştır. Balıklarda virüs ve bakterilerin yanı sıra parazitlerden de ileri gelen çeşitli hastalıklar görülmekte bu da balıkçılık sektörünü olumsuz etkilemektedir. Diğer taraftan balıklardaki bazı paraziter zoonozlar insanlara da bulaşabildiğinden halk sağlığı ve gıda güvenliği yönünden de önem taşımaktadır (Şimşek ve Yılmaz, 2016; Guardone, et al., 2018).

Balık parazitleri sucul ekosistemin ayrılmaz bir parçasıdır. Tatlı ve tuzlu su olmak üzere göl, akarsu, deniz gibi doğal alanlarda ya da kültüre edilen balık popülasyonlarında yaygın olarak bulunurlar. Parazitler balıklarda doğal koşullarda az sayıda olduklarında genellikle önemsiz kabul edilmekte, ancak fazla sayıda ve yoğun olarak bulduklarında sorun oluşturmaktadır. Parazitler içerisinde yer alan nematodlar Nemathelminthes kökünde yer alan vücutları bölünmemiş, uzun ve

silindirik yapıya sahip olan ayrı cinsiyetli helmintlerdir. Nematodların önemli bir bölümü serbest yaşam sürerken, bir bölümü ise insan ve hayvanlarda paraziter yaşama uyum sağlamışlardır. Bir bölümü direkt geliştiği halde bir bölümü gelişmelerinde ara/paratenik konağa gereksinim duyarlar. Animalia aleminde 256 aileden ve 40.000'den fazla türden oluşan en önemli ve en geniş grubu oluştururlar (Williams and Jones, 1994; Anderson, 2000; Umur, vd., 2006).

Nematod parazitlere tatlı su, deniz ve acı su balıklarında sıklıkla rastlanır. Birbirinden farklı türler konaklarının vücut kondisyonlarını, yüzme performanslarını, üreme kabiliyetlerini ve hematolojik profillerini etkilerler ve ciddi hastalık tablosu oluşturarak yüksek oranlarda ölümlere neden olabilirler. Balıklarda ergin nematodlar çoğunlukla sindirim sisteminde parazitlenirken, larvalar vücut boşluğu, iç organların yüzeyinde ya da paranziminde bulunurlar (Moravec, 1994; Molnár, et al., 2006; Choundhury and Cole, 2008).

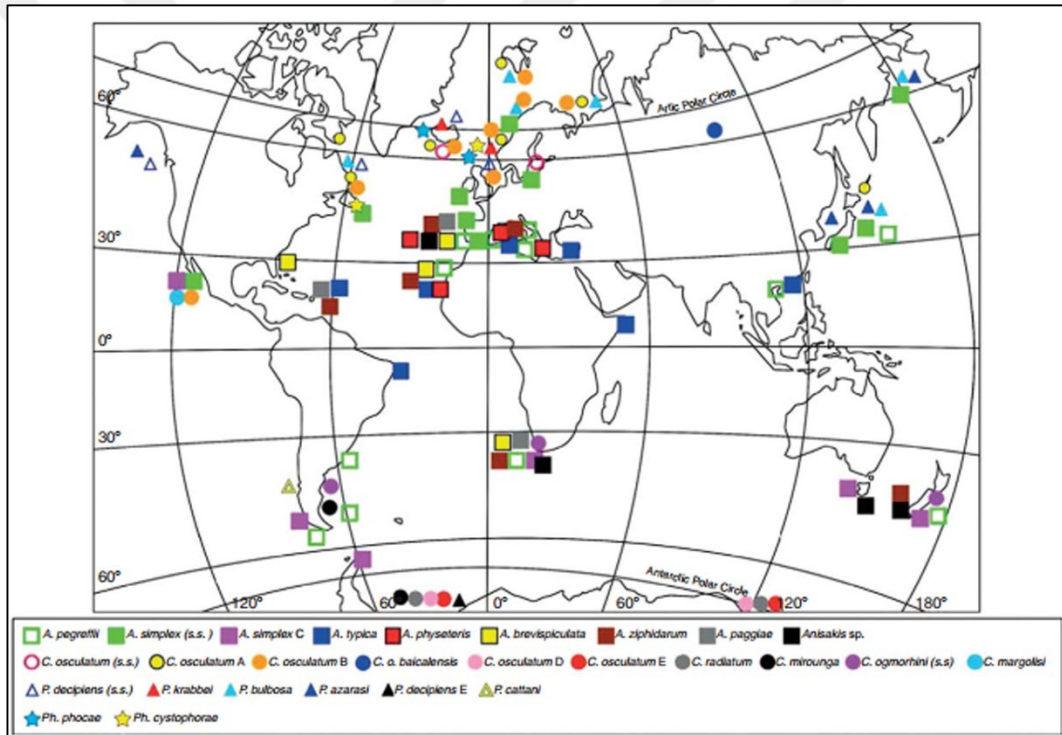
Nematodlar tipik olarak uzun, her iki ucu sivri, bilateral simetrik ve yalancı vücut boşluğuna (psöydosöl) sahip canlılardır. Büyüklükleri çok değişkendir ve 1 mm'den küçük ya da 1 m'den uzun olabilirler. Hareket vücuttaki kaslar ve psöydosöldeki sıvının basıncına bağlı olarak hareket solucanımsı/yılanımsı şekildedir. Vücut hipodermis tarafından salgılanan ve kütikula olarak adlandırılan hücresiz bir tabaka ile kaplıdır. Vücut çeperindeki kaslar tek tabaka olup, sadece uzunlamasına seyrederek ve sirküler kaslar yoktur. Sindirim sistemi gelişmiş olup, ağız, barsak ve anüsleri vardır. Sinir sistemi genel olarak basit olup, vücudun farklı bölümlerindeki hareketin mekanik eşgüdümü, hemolenf hacmindeki yerel değişiklikler ve lokal reflekslerle sağlanır. Boşaltım sistemi lateral kanallar veya ventral bezler ile bazen de her ikisinden oluşur. Bu sistem vücudun ön ucuna yakın yerde ventral bir delikle sonlanır. Nematodların çoğu ayrı cinsiyetlidir ve genelde dişi parazitler erkeklerden daha büyüktür. Erkek ve dişiler dıştan morfolojik olarak ayrılabilirler (Seksüel dimorfizm). Eşey organları ayrı organlar şeklinde ve genellikle dış ortamla bağlantı kuran kanallar biçimindedir. Dişilerin arka ucu genellikle sivri olduğu halde erkeklerin kıvrık veya genişlemiş olarak sonlanır (Moravec, 1994; Umur, vd., 2006). Balıklarda bulunan nematodlar çoğunlukla ovipardırlar ve yumurtlayarak çoğalırlar. Bununla birlikte çok sayıda vivipar olan nematod türleri bulunmaktadır (Izyumova, 1964; Moravec, 1994). Nematodlar yaşam döngülerinde

tatlı su ya da deniz balıklarını kesin, ara ya da paratenik konak olarak kullanırlar (Choundhury and Cole, 2008).

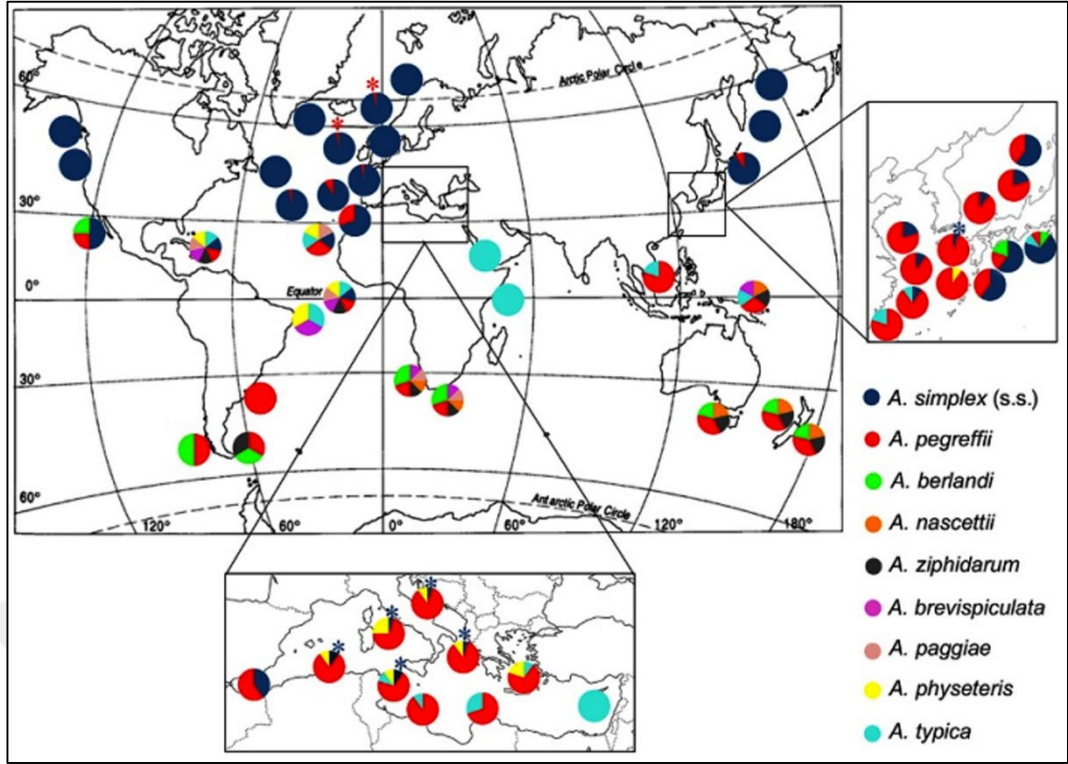
Çoğu paraziter hastalık için halk sağlığı otoritelerine bildirim zorunlu olmadığı için resmi raporlar bu hastalıkların gerçek prevalansını veya sıklığını yansıtmamaktadır. Bu parazitler gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre çok daha yaygındır (FAO/WHO, 2014; Baird, et al., 2014). Bununla birlikte artan uluslararası pazarlar, gelişmiş ulaşım sistemleri, demografik değişiklikler, duyarlı insan nüfusunun artması ve değişen mutfak alışkanlıkları nedeniyle bu coğrafi sınırlar ve risk altındaki popülasyonlar genişlemektedir. Su ürünleri endüstrisinin küreselleşmesiyle birlikte insanların anisakiosis edinme riskinin gelişmiş ülkelerde hafife alındığı ve küçümsendiği görülmektedir. Ancak insanlarda dünya çapında anisakiosis vaka raporları gün geçtikçe artmaktadır (Dorny, et al., 2009; Baird, et al., 2014; Molina-Fernández, et al., 2015; Guardone, et al., 2018).

2.1. Anisakidae Ailesindeki Nematodlar Hakkında Genel Bilgiler

Ichtyozoonoz özelliği gösteren en önemli paraziter etkenler Anisakidae ailesinde yer alan *Anisakis* (Dujardin, 1845), *Pseudoterranova* (Krabbe, 1878) ve *Contracaecum* (Railliet and Henry, 1913) cinslerinde yer alan nematod türlerdir. Bu nematod türlerinin insanlarda oluşturduğu hastalık anisakiosis olarak bilinmektedir. Anisakidae ailesinde yer alan *Anisakis*, *Pseudoterranova* ve *Contracaecum* cinsinde yer alan parazitlerin deniz memelileri ve su kuşları son konağı iken omurgasız su kabukluları ile deniz balıkları ara konak olarak görev almaktadırlar. Dünya genelinde Anisakidae ailesine ait ergin ve larval nematodlar kesin ve ara konaklarında yaygın olarak görülmektedir (Mattiucci and Nascetti, 2006, 2008; Mattiucci, et al., 2014; 2018; Rahmati, et al., 2020) (Şekil 2.1, 2.2).



Şekil 2.1. *Anisakis* (□), *Pseudoterranova* (△), *Contracaecum* (○) ve *Phocascaris* (*) türlerinin dağılım alanlarını gösteren dünya haritası. Belirtilen coğrafi alanlar kesin ve ara konakların örneklem bölgeleriyle ilgilidir (Mattiucci and Nascetti, 2008)

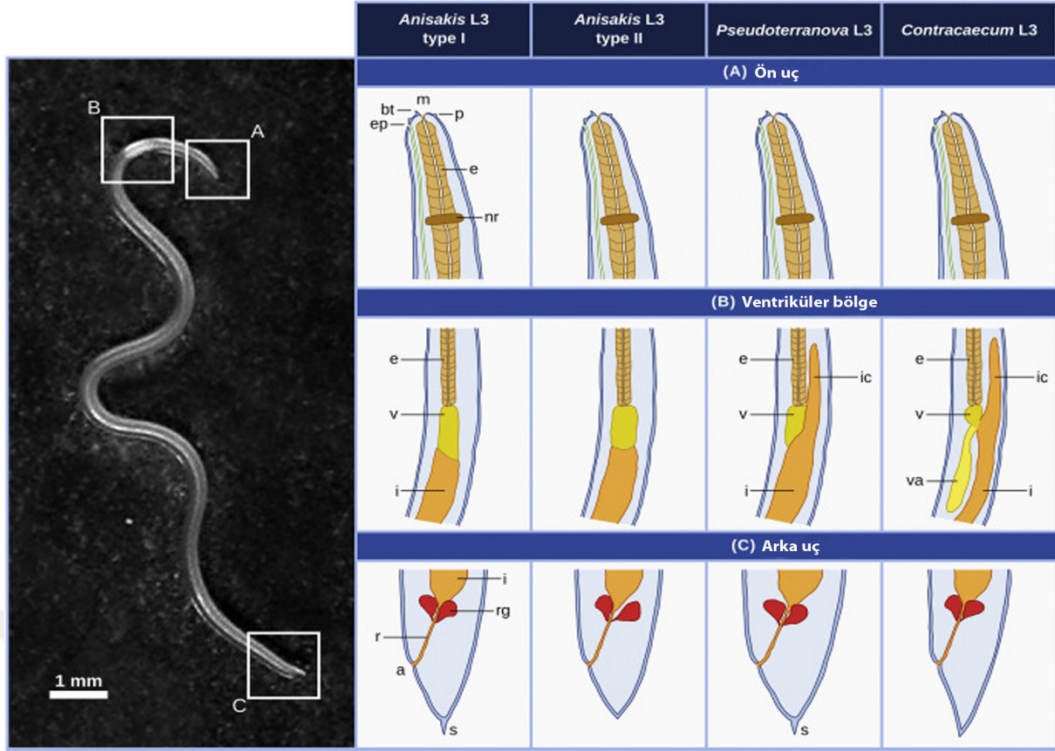


Şekil 2.2. Farklı coğrafik avlanma alanlarına göre *Anisakis* spp. türlerinin dağılımı ve oranları. Ticari öneme sahip balıklardaki *Anisakis* türlerinin moleküler epidemiyolojisinden elde edilen veriler (Mattiucci, et al., 2018)

Anisakidae ailesindeki nematodların vücut yapısı silindirik şeklindedir. Her iki uç sivri ve uzunlamasına bir gövde yapısı vardır. Duyusal/algısal papillere sahip dudaklarla çevrili bir ağız boşluğu vardır. Bu nematodların kütikülü ince çizgilerle karakterizedir. Birçok cinste kütikül dudak tabanının arkasında olukludur. Oral açıklık bir dorsal ve iki subventral olmak üzere üç dudakla çevrilidir. Genellikle dorsal dudakta iki eşit papilla ve subventral dudakların her birinde bir papilla ve amfid vardır. Dudaklar arasında interlabia olabilir. Ağız boşluğu sonrasında özofagus, bağırsak, rektum ve anüs gelir. Özofagus proventrikülüs ve ventrikülüs olmak üzere iki kısma ayrılır. Ventrikülüs bağırsağı ve proventrikülüsü birleştirir ve ventriküler çıkıntı olarak adlandırılan bir veya birkaç posterior çıkıntıya sahip olabilir. Bağırsak kolon epitel hücre tabakası ile kaplı basit bir tüptür. Bazı cinslerde bağırsak, sekum olarak adlandırılan ve anterior olarak yönlendirilmiş bir kör keseye sahip olabilir. Sekum lümeni sitolojik olarak bağırsağa benzer. Boşaltım ve sinir sistemleri mevcuttur. Boşaltım sistemi ve onun dış açıklığı olan boşaltım deliği subventral dudakların dibinde açılır. Periferik sinir sistemi yüzey papillalarını ve amfidleri birbirine bağlayan bir sinir örgüsünden oluşur. Sinir sistemleri yemek borusunu ön kısımda çevreleyen bir dizi gangliyon olan sinir halkası olarak

yoğunlaşır. Cinsiyetler genellikle ayrıdır. Arka kısım genellikle dişilerde düzdür ve erkeklerde kavislidir. Erkek üreme sistemi sarmal bir testis, seminal vezikül, vas deferens ve kloakada sonlanan ejakülatör kanaldan oluşur. Spiküller ve gubernakulum gibi çiftleşmeye yardımcı organların yanı sıra kaudal papillalar ve bazılarında post kloakal çıkıntılar içerir. Genellikle şekil olarak değişen iki spikül vardır. Bir gubernakulum sadece birkaç cinsten bulunur. Bazı türlerin kuyruğunun ucu çok sayıda diken taşır. Dişi genital organları ovaryum, ovidukt, seminal bezler, uterus, vajina ve vulvadan oluşur. Vulva ventral tarafta ve genellikle vücudun ön yarısında görülür. Yumurtaların büyüklüğü ve kabuk yapısı değişkenlik gösterir. Tüm vücut hipodermis tarafından salgılanan şeffaf, hücresel olmayan bir kütikül ile kaplıdır. Nematodlar gömlek değiştirerek bir dizi aşamalardan geçerler. Her aşamada eski kütikül altında yeni bir kütikül tabakası oluşur ve bu tabaka sonunda dökülerek aşamayı sonlandırır.

Anisakis cinsinin bir ön çıkıntı (diş) taşıyan üç dudağı vardır ve interlabia yoktur. Boşaltım deliği subventral dudağın tabanına açılmaktadır. Özofagusun ön kısmı kaslıdır ve arka kısmında ventrikülü vardır. Ventrikül tek parçadır ve ventriküler çıkıntısı veya bağırsak sekumu yoktur. Vulva vücudun orta veya ilk üçte birindedir. Erkek bireylerin spikülleri eşit olmayıp, preanal ve postanal papil çok sayıdadır. Arka uçlarında tek bir çıkıntı şeklinde (mucron) diken bulunur (Myers, 1975; Anderson, 2000; Adroher-Auroux and Benítez-Rodríguez, 2020) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Balıklarda sıklıkla görülen ve potansiyel olarak anisakiosise neden olabilen nematodların üçüncü evre larvaları (L3) arasındaki farklı morfolojik özellikler. **a:** anüs; **bt:** diş; **e:** yemek borusu, **ep:** boşaltım deliği, **i:** bağırsak; **ic:** bağırsak sekumu, **m:** ağız, **nr:** sinir halkası, **p:** papilla, **r:** rektum, **rg:** rektal bez, **s:** mukron; **v:** ventrikül, **va:** ventriküler çıkıntı (Adroher-Aurox and Benítez-Rodríguez, 2020)

Anisakidae ailesinin ve bu ailede yer alan cinslerin taksonomisi (NCBI Taxonomy) aşağıda belirtilmiştir (Schoch, et al., 2020).

Alem: Metazoa

Şube: Nematoda

Sınıf: Chromadorea

Takım: Rhabditida

Üst aile: Ascaridoidea

Aile: Anisakidae

Cins: *Contracaecum*

Cins: *Pseudoterranova*

Cins: *Opidascaris*

Cins: *Phocascaris*

Cins: *Pseudanisakis*

Cins: *Pulchrascaris*

Cins: *Raphidascaroides*

Cins: *Sulcascaris*

Cins: *Terranova*

Cins: Sınıflandırılmamış Anisakidae

Cins: *Anisakis*

Anisakis simplex kompleksi

Anisakis berlandi

Anisakis pegreffii

Anisakis simplex (herring worm)

Anisakis simplex x *Anisakis pegreffii*

Anisakis brevispiculata

Anisakis nascettii

Anisakis paggiae

Anisakis cf. paggiae AV60.8

Anisakis physeteris

Anisakis typica

Anisakis cf. typica 1 HWP-2008

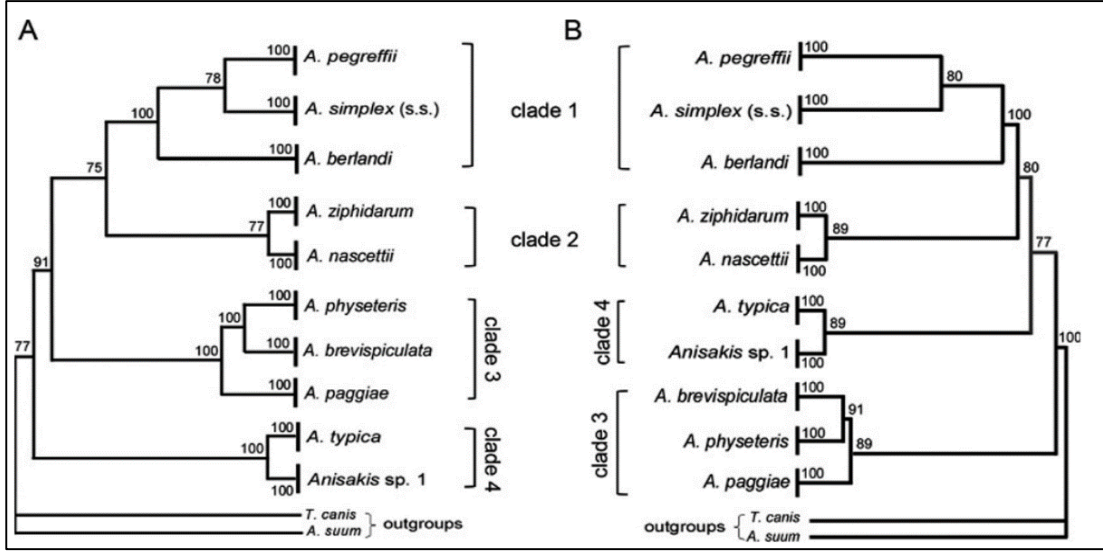
Anisakis cf. typica 2 HWP-2008

Anisakis ziphidarum

Sınıflandırılmamış *Anisakis*

Anisakidae ailesinde farklı cinslere bağlı çok sayıda tür bulunmaktadır. Bu cinsler içerisinde bazıları türlerin morfolojik özelliklerindeki benzerlikten dolayı sibling (ikiz) türler söz konusudur. Benzer özellikleri olan cinsler bazı literatürlerde sinonim olarak bildirilirken, bazılarında farklı cinsler olarak belirtilmiş ve bu durum tam olarak bir netlik kazanmamıştır. Bu nedenle balıklardan izole edilen larvaların morfolojik olarak sadece cins düzeyinde teşhisi söz konusu olmaktadır. Parazitlerin tür düzeyinde kesin teşhisleri moleküler teknikler ile mümkün olmaktadır.

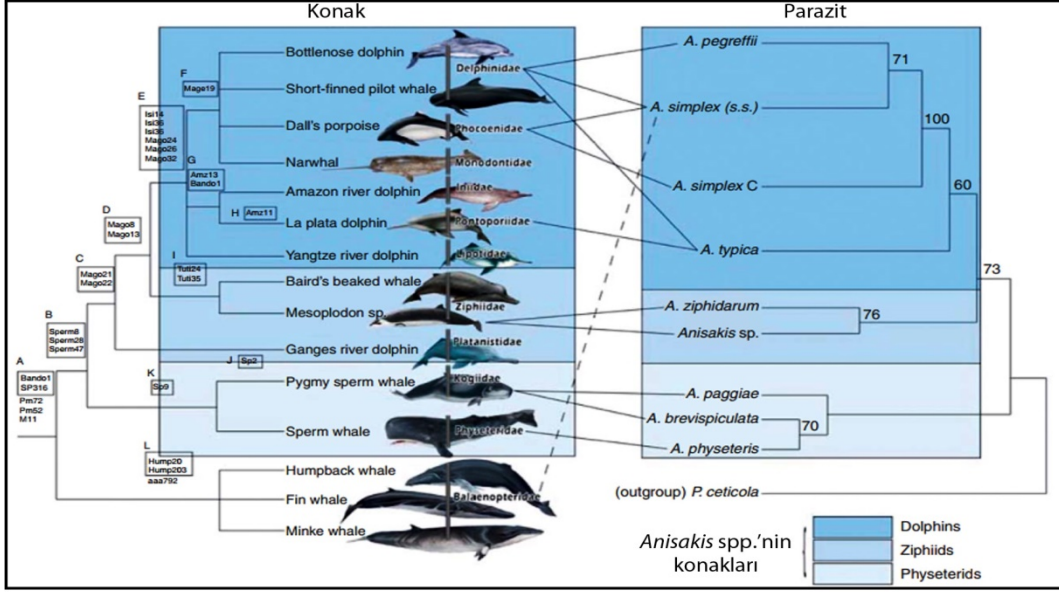
Anisakidae ailesindeki en önemli zoonotik grup *Anisakis* türleridir. *Anisakis* cinsi altında bulunan *A. simplex* kompleksi (sensu lato (s.l)) grubu kriptik türleri içermektedir. Bu türler *A. berlandi* (*A. simplex* C), *A. pegreffii*, *A. simplex* sensu stricto (s.s.) türleridir. Kriptik türler morfolojik olarak ayırt edilemezler ve tür identifikasyonu için moleküler teknikler kullanılmaktadır. Kriptik türler haricinde *A. typica*, *A. ziphidarum*, *A. physeteris*, *A. brevispiculata*, *A. paggiae*, *A. nascetti* ve *A. schupakovi* ve *Anisakis* sp. 1 ve *Anisakis* sp. 2 gibi diğer farklı türler de bulunmaktadır. *Anisakis* cinsi içerisinde yer alan larvaların morfolojik ayrımları sahip oldukları vücut özellikleri dikkate alınarak *Anisakis* tip I larva ve *Anisakis* tip II larva şeklinde sınıflandırma yapılmıştır. Bu türler arasında genetik yapılar, yaşam döngüleri ve coğrafik dağılımları açısından farklılıklar vardır. *Anisakis* cinsi içerisinde yer alan çok sayıdaki türün nükleer ribozomal DNA'larındaki ITS gen bölgesinin ve mitokondrial DNA'larındaki *cox 2* gen bölgesinin genetik analizleri sonucunda tür bazında ayrımları yapılmaktadır. Günümüzde *Anisakis* cinsi içinde mitokondriyal (*cox 2* ve *rrnS*) ve nükleer (ITS rDNA) veri setlerine dayanan filogenetik analizinden dört farklı dalın varlığı açıkça anlaşılmaktadır. Birinci dal *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii*, *A. berlandi*, ikinci dal *A. ziphidarum* ve *A. nascetti*, üçüncü dal *A. physeteris*, *A. brevispiculata* ve *A. paggiae* ve dördüncü dal *A. typica* ve *Anisakis* sp. 1 türlerini içermektedir (Berland, 1961; Myers, 1975; Fagerholm, 1982; Mattiucci, et al., 1997; 2001; 2002; 2005; Paggi, et al., 1998; D'Amelio, et al., 2000; Martin-Sanchez, et al., 2005; Valentini, et al., 2006, Mattiucci and Nascetti, 2006; Mattiucci, et al., 2014; 2018) (Şekil 2.4).



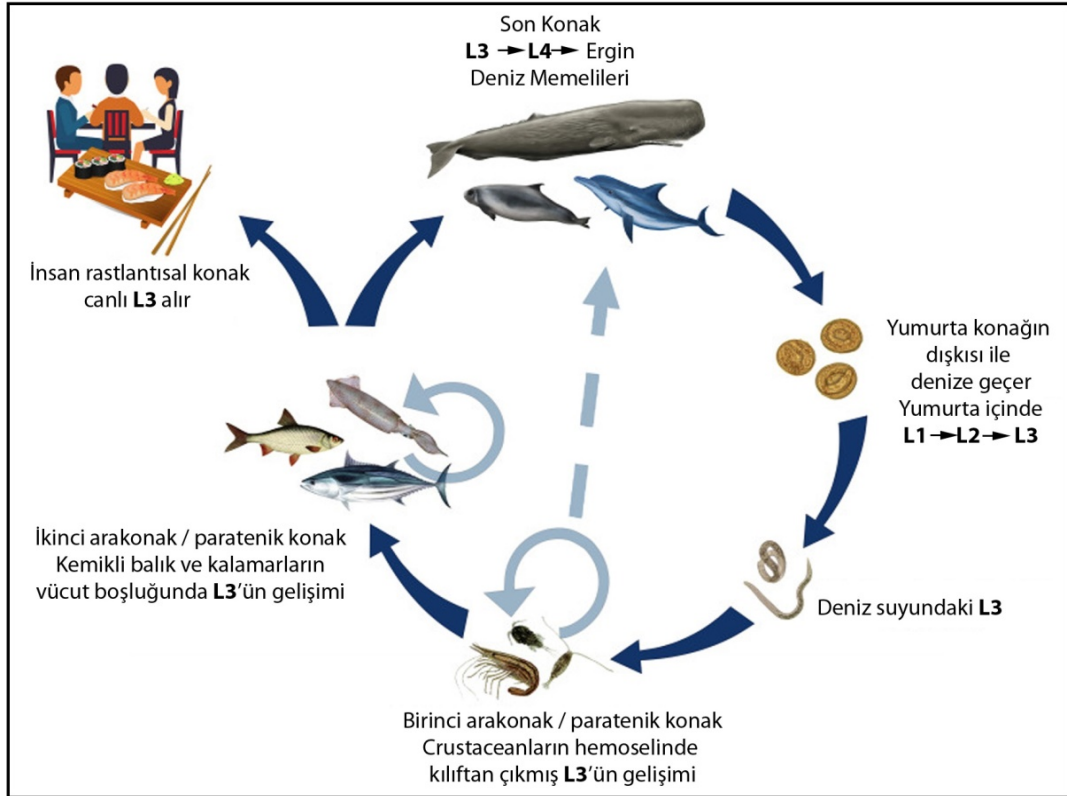
Şekil 2.4. *Anisakis* türleri arasındaki filogenetik ilişkiler. (A) *Anisakis* spp'nin birleştirilmiş mitokondriyal (*cox 2* ve *rrnS*) ve nükleer (ITS rDNA) dizisine dayalı maksimum parsimoni ağacı, (B) birleştirilmiş mitokondriyal *cox 2* ve *rrnS* genlerine dayalı maksimum parsimoni ağacı. Bootstrap değerleri >70 olanlar iç düğümlerde gösterilmiş ve dış grup olarak *Toxocara canis* ve *Ascaris suum* türleri kullanılmıştır (Mattiucci, et al., 2018)

Anisakis türlerinin yaşam döngüsünün birçok yönü hala belirsizliğini korumaktadır. Bu parazitlerin yaşam döngüsünde deniz memelileri (çoğunlukla cetaceanlar) kesin/son konak, deniz balıkları ve kalamar gibi kafadanbacaklılar ikinci ara veya paratenik konak iken, planktonik veya semiplanktonik kabuklular birinci ara veya paratenik konaklardır. *Anisakis* türlerinin yaşam döngüsüne dahil olabilecek çok sayıda deniz canlısı olmasına rağmen tüm deniz memelileri *Anisakis* türleri için uygun ya da kesin konak değildir. Deniz memelilerinden Delphinidae ailesindekiler *A. simplex* s.l. ve *A. typica*, Ziphiidae ailesindekiler *A. ziphidarum* ve *A. nascetti*, Physeteridae ailesindekiler *A. physeteris* ile Kogiidae ailesindekiler ise *A. paggiae* ve *A. brevispiculata* türleri için ideal konaktır (Şekil 2.5). Dişi parazit erkek tarafından döllendikten sonra dişi parazitin yumurtaları kesin konaktan dışkı ile atılarak deniz ortamında embriyonlanır. Yumurtanın içerisinde L1 ve L2 gelişir. Larvalı yumurtalar çoğunlukla küçük kabuklular olmak üzere birinci ara /paratenik konak olan omurgasızlar tarafından yutulur. Larvaları taşıyan bu birinci ara/paratenik konaklar daha sonra kafadanbacaklılar ve deniz balıkları dahil olmak üzere çok çeşitli ikinci ara veya paratenik konaklar tarafından yenir ve bu canlılarda L3 gelişir. *Anisakis*'lerin yaşam döngüsündeki diğer bir görüşe göre yumurtaların içinde larvalar L3 dönemine kadar gelişir ve sonradan yumurtayı terk eder. Bu L3'ler 200–300 µm uzunluğundadır ve L2 kütikül kılıfı ile çevrelenmiş olup deniz suyunda 3–4 aya kadar yaşayabilirler. L3'ler birinci ara/paratenik konaklar tarafından alındıktan sonra

kılıfını kaybederek kabukluların sindirim sisteminden sölomik boşluğa geçerek enfektif hale gelirler. L3'ü taşıyan birinci konağı yiyen ikinci ara/paratenik konaklar enfekte olabilirler. Son konaklar tarafından L3'ü taşıyan ara/paratenik konaklar yenildiğinde enfekte olurlar, L3'ler L4'e gömlek değıştirirler ve daha sonra parazitin ergin erkek ve diş formaları son konak deniz memelilerinin midesinde gelişir. L3 taşıyan deniz balıkları başka bir balık tarafından yenilebilir ve L3'ler yeni konağı enfekte eder ve bu olgu birkaç kez tekrar edebilir. Muhtemelen bu durum yırtıcı deniz balıklarında larvaların çok sayıda birikmesine neden olur. L3'lerin davranışında bilinmeyen bazı faktöre bağılı olarak bazı durumlarda L3'lerin çoğı balığın visseral boşluğunda veya iç organların içinde kalırken, bazı durumlarda larvalar balığın kaslarına göç edebilmektedir. İnsanlar *Anisakis* türlerinin yaşam döngüsünde tesadüfi rastlantısal konaktır. İnsanlar çiğ veya az pişmiş balık veya kalamar tüketmekle L3'ler ile enfekte olabilir ve özofagial, mide, bağırsak ve alerjik formları olan anisakiosisten etkilenebilir. Enfekte insanlarda L3'ler çoğalmaz. İnsan enfeksiyonlarında ergin *Anisakis* türleri bildirilmemiştir (Sakanari and McKerrow, 1989; Roepstorff, et al., 1993; Køie, et al., 1995; Klimpel, et al., 2004, 2010; Chai, et al., 2005; Pascual and Abollo, 2005; Mattiucci and Nascetti, 2008; Hochberg, et al., 2010; Levsen and Lunestad, 2010; Karl, et al., 2011; Bao, et al., 2013; Baird, et al., 2014; Cipriani, et al., 2016; Levsen, et al., 2018; Mattiucci, et al., 2018; Adroher-Auroux and Benítez-Rodríguez, 2020) (Şekil 2.6). Ayrıca deniz memelilerini ve balıklarını enfekte eden *A. simplex* türünün L3'leri Petromyzontidae ailesindeki dişli çenesiz balık (*Petromyzon marinus*) türleri ile tatlı su kaynaklarına taşınabilmektedir (Bao, et al., 2013).

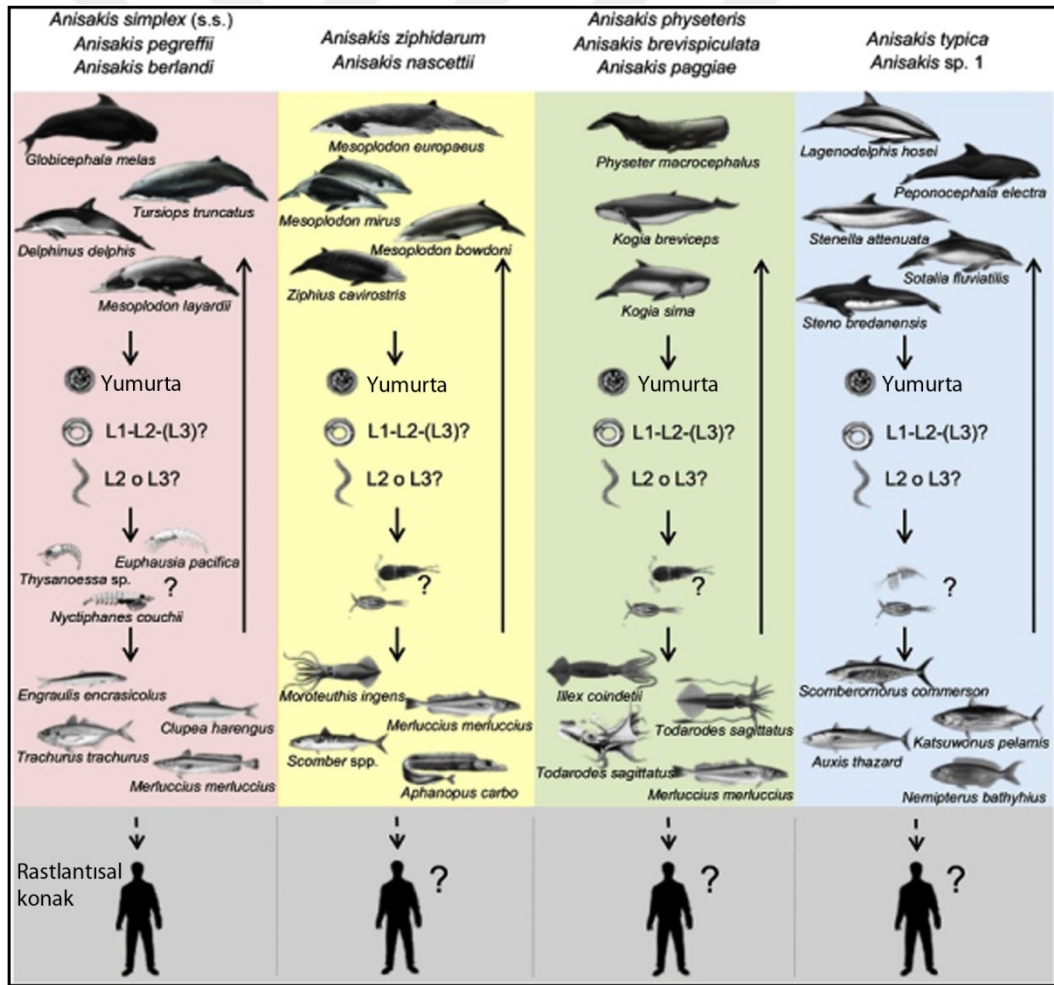


Şekil 2.5. *Anisakis* spp. ve deniz memelilerinin filogenetik ilişkisi. Bu tanglegram mtDNA *cox 2* geninin dizi analizleri ile tanımlanan *Anisakis* spp.'lerin filogenisi ile haritalanmış deniz memelisinin filogenisini göstermektedir (Mattiucci and Nascetti, 2008)



Şekil 2.6. *Anisakis* spp.'nin yaşam döngüsü (Adroher-Auroux and Benítez-Rodríguez, 2020)

Anisakiosis ciddi zoonotik bir hastalıktır ve son yıllarda tüm dünyada dramatik bir şekilde tüketicilerde görülme sıklığı giderek artmaktadır. İnsanlardaki anisakiosis olgularındaki artış birtakım nedenlere dayandırılmaktadır. Bunlar son konak olan deniz memelilerinin sayılarının artması, küresel dünya mutfak kültürünün oluşmasıyla tüketim tercihlerinin değişmesi, hızlı yemek pişirme tekniklerinin yaygınlaşması, gıda ürünlerinin içerdiği vitaminlerden daha fazla faydalanabilmek için az pişirme tekniğinin popüler hale gelmesi ve sağlıklı olduğu vurgulanan balık eti tüketiminin hızla artması şeklinde sıralanabilmektedir. *Anisakis* türleri arasında en önemli zoonotik karakterli türler *A. pegreffii* ve *A. simplex* (s.s)'dir (Şekil 2.7). Bu iki tür insanlardaki sindirim sistemi problemlerinde ve alerjilerde teşhis edilmiştir (D'Amelio, et al., 1999; Mattiucci, et al., 2007; 2011; 2013; 2017; 2018; Umehara, et al., 2008, Fumarola, et al., 2009; Arizono, et al., 2012; Lim, et al., 2015; Mladineo, et al., 2015; Yera, et al., 2016; Guardone, et al., 2018).



Şekil 2.7. *Anisakis* türlerinin yaşam döngüsü ve zoonotik rolleri (Mattiucci, et al., 2018)

Bu türlerden *A. pegreffii* türü Akdeniz’de baskın türdür ve 200 ‘den fazla balık türlerinde bildirilmiştir (Mattiucci, et al., 2018). *Anisakis pegreffii* ve *A. simplex* (s.s.) türlerinin yer aldığı *A. simplex* (s.l) grubunda 14 alerjen (Ani s 1–Ani s 14) tespit edilmiştir. Bu alerjenlerden Ani s 1, 2, 7, 12, 13 ve 14 alerjenleri major antijenlerdir ve *Anisakis* gastro-alerjik hastaların %50–86’da rapor edilmiştir (Quiazon, et al., 2003; Carballeda-Sangiao, et al., 2016a). Bu alerjenlerin tüketiciler tarafından uygulanan pişirme yöntemlerinde kullanılan ısı işlemlere ve mide de bulunan pepsin enzimine dayanıklı oldukları ve antijenik yapılarını korudukları saptanmıştır. Gıdalara uygulanan pişirme ve dondurma işlemlerinin *Anisakis* larvalarını öldürdüğü fakat larvaların alerjik yapılarını inaktive etmediği bilinmektedir. Yüksek ısılarda uygulanan pişirme yöntemlerinde (94⁰C’de 3 dk) bile *Anisakis* larvalarının yüzey antijenleri ile major antijenleri tespit edilebilmiştir (Quiazon, et al., 2003; Caballero and Moneo, 2004; Vidaček, et al., 2009; 2010; Carballeda-Sangiao, et al., 2016a). *Anisakis* alerjenlerinin donmuş balık ve balık ürünlerinde 220 gün sonra bile tespit edildiği ve tüketicilere risk oluşturduğu bilinmektedir (Tejada, et al., 2014). Yine donma işlemi sırasında ve sonrasında *Anisakis* larvalarından alerjenlerin serbest kaldığı yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Sánchez-Alonso, et al., 2018). *Anisakis* larvaları ile enfekte balık ve balık ürünlerinin iyi pişirilse bile larvaların termo-stabil alerjenlerinin tüketicilerde alerjik reaksiyonlara yol açabileceği bilinmektedir. *Anisakis* türlerinin karmaşık yaşam döngüsü ve çok sayıda potansiyel konağı (özellikle paratenik konak) olması nedeniyle kontrol edilmesi zordur. Bununla birlikte insanlarda anisakiosisin insidansını azaltmak için çeşitli önlemler alınabilir. Bunlar temelde tüketicilerde hastalıktan korunma konusunda farkındalık yaratması gereken sağlık eğitimidir. Bu eğitim genişletilmeli ve tedarik veya balıkçılık gibi farklı ekonomik sektörlere uyarlanmalıdır (Adroher-Auroux and Benítez-Rodríguez, 2020). Tüketicilerin canlı *Anisakis* larvalarını öldürmesi ve enfekte olmalarının engellenmesi için Avrupa Birliği ile FDA (U.S. Food and Drug Administration) kurumunun balık ve balık ürünlerin dondurulması ve pişirilmesi ile ilgili bazı önerileri bulunmaktadır. Bu öneriler doğrultusunda balık ve balık ürünlerinin -20⁰C’de en az 24 saat (Avrupa Birliği) ile -20⁰C’de en az 7 gün ya da -35⁰C’de en az 15 saat (ABD–FDA) dondurulması önerilmektedir. Pişirme sıcaklığının 60⁰C’nin altında 10 dakika ile 55–60⁰C arasında 1 dk uygulanması önerilmektedir. Önerilen dondurma ya da pişirme yöntemlerinde canlı *Anisakis* larvaları ölmektedir. Fakat ölen *Anisakis* larvalarının

major alerjenleri insanlarda alerjik reaksiyonlara (gastro-alerjik anisakiosis) neden olmaktadır (Quiazon, et al., 2003; Moneo, et al., 2005; Audicana and Kennedy, 2008; Daschner, et al., 2012; Baird, et al., 2014; Carballeda-Sangiao, et al., 2016a; Mazzucco, et al., 2018).

Tüketicilerde anisakiosis iki şekilde meydana gelmektedir. Birincisinde çiğ ya da az pişmiş balık ve balık ürünlerinin tüketilmesi sonucunda alınan canlı L3'lerin özofagus, mide ve bağırsak duvarına invaze olup yerleşerek eozinofilik granülomların oluşumuna ve şiddetli karın ağrılarına neden olmaktadır. Bu durum akut invaze form olarak isimlendirilmekte ve çok ciddi gastrointestinal semptomlara neden olmaktadır (Bouree, et al., 1995; Moreno-Ancillo, et al., 1997; Audicana, et al., 2002; Mattiucci, et al., 2018). Akut invaze formlu anisakiosisli hastalarda mide bulantısı, kusma, şiddetli karın ağrısı ve ishal gözlemlendiği ve alınan anamnezde hastanın 8–24 saat önce çiğ balık eti ya da az pişmiş balık eti ile yapılan yiyeceklerden yemiş oldukları kaydedilmiştir (Kagei and Isogaki, 1992; Bouree, et al., 1995; Takabe and Schuster, 1998). İnsanda anisakiosis farenks, özofagus, mide, duodenum, jejunum, ileum, apendiks, kolon ve rektumda görülmüştür. Kronik invaze formda ise *Anisakis* larvalarının mide ya da bağırsakta lokalize olduğu bölgelerde ülserasyon, hemorajik odak ve diffüz tümörler şekillenmektedir. Eozinofilik apseler, flegmonlar ve granülomların histopatolojik incelemelerinde patolojik yapıların içinde *Anisakis* larvaları bulunmuştur (Jones, et al., 1990; Bouree, et al., 1995; Mladineo, et al., 2015; Palma, et al., 2018).

Anisakiosis olaylarında asıl önemli olan IgE kaynaklı şekillenen “alerjik anisakiosis”dir. Alerjik anisakiosis olaylarında *A. pegreffii* ve *A. simplex* (s.s.) türleri sorumlu tutulmaktadır. Alerjik anisakiosis *Anisakis*-IgE hipersensitivitesine bağlı olarak şekillenmektedir. *Anisakis* larvaları tüketicilerde akut ya da kronik alerjik hastalıklara neden olur. Akut anisakiosiste oluşan tip I ve/veya tip III alerjik reaksiyon 2–3 saat içinde şekillenebileceği gibi 2–3 gün sonra da ortaya çıkabilmektedir. Anisakiosiste oluşan alerjik reaksiyonlar sonucu insanlarda ürtiker, akciğer rahatsızlıkları, alerjik ödem, poliartritis, konjunktivitis, kontakt dermatitis, Crohn's hastalığı ve eozinofilik gastroenteritis olguları şekillenmektedir (Bouree, et al., 1995; Moreno-Ancillo, et al., 1997; Daschner, et al., 2000; Moneo, et al., 2000; Mattiucci, et al., 2018). İnsanlarda ürtikerin şekillenmesinde parazitin alerjenlerine karşı şekillenen tip I ve/veya tip III alerjik reaksiyonlar neden olmaktadır. *Anisakis*

pegreffii türüne bağlı şekillenen alerjik anisakiosis olgularında enfekte insan serumunda ELISA ve diğer immünolojik teknikler ile Ani s 1, Ani s 7 ve Ani s 13 antijenleri teşhis edilmektedir. Bununla birlikte *Anisakis* larvalarının ölmesi için uygulanan pişirme ya da dondurma işlemleri parazite duyarlı kişilerde alerjik reaksiyonların şekillenmesini önleyememektedir. *Anisakis* larvaları ile enfekte deniz ürünlerinin pişirilerek tüketimi sonucunda bile duyarlı bireylerde anafilaksi reaksiyonları şekillenmektedir (Moreno-Ancillo, et al., 1997; Audicana, et al., 2002; Mattiucci, et al., 2018). *Anisakis* türlerine karşı şekillenen IgE duyarlılığının tüketicilerde çok uzun süre devam ettiği ve bazı hastalarda 8 yıldan daha uzun sürelerde bile *Anisakis* spesifik IgE'nin tespit edildiği bildirilmiştir (Carballeda-Sangiao, et al., 2016b). Yine yapılan araştırmalarda *Anisakis* larvalarının alerjik peptitlerinin balıkçılık sektöründe ve bu sektöre bağlı alanlarda çalışan insanlarda astım hastalığına neden olduğu bildirilmektedir (Moneo, et al., 2000). İnsanlarda alerjik anisakiosis olguları serolojik olarak teşhis edilmektedir. İnsanlarda *A. pegreffii* ve *A. simplex* (s.s.) larvalarına karşı serum spesifik IgE hipersensitizasyonu ELISA, Western Blot, SDS-PAGE ve hızlı test tanı kitleri ile kolaylıkla teşhis edilebilmektedir (Mattiucci, et al., 2018).

Anisakis larvalarının balık dokularında görsel muayenesine dayalı en yaygın kullanılan tespit yöntemleri şunlardır: (1) balık filetolarının ışıklı masalarda görsel muayenesi (mumlama) (EFSA, 2010), (2) yapay peptik sindirim (Gómez Mateos, et al., 2016; Llarena-Reino, et al., 2013; Lunestad, 2003; Lysne, et al., 1995; Thien, et al., 2007; Thu, et al., 2007) ve (3) preslenmiş ve dondurulmuş balık numunelerinin UV ışığı altında incelenmesi (UV-Press) yöntemidir (Cipriani, et al., 2015; 2016; 2017a; b; Karl and Levsen, 2011; Levsen and Karl, 2014; Levsen and Lunestad, 2010; Levsen, et al., 2017a; Mladineo et al., 2017b).

2.2. Ülkemiz Karasularında Avlanan ve İthal Edilen Deniz Balıklarındaki *Anisakis* Türlerinin Moleküler İdentifikasyonu

Gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından *Anisakis* türlerinin moleküler identifikasyonu amacı ile ülkemiz karasularında avlanan ve Norveç ile Senegal gibi ülkelerden ithal edilen deniz balıklarında araştırmalar yapılmıştır (Pekmezci, 2014, 2019; Pekmezci, vd., 2014a; Simsek, vd., 2020). Bu araştırmalarda ülkemiz karasularında avlanan ve ithal edilen deniz balıklarında en önemli balık kaynaklı zoonozlar arasında yer alan *A. pegreffii* ve *A. simplex* (s.s.) türleri moleküler olarak tespit edilmiştir (Pekmezci, 2014, 2019; Pekmezci, vd., 2014a; Simsek, vd., 2020). Karadeniz, Ege ve Akdeniz kıyılarında yakalanan ve yetiştirilen 31 farklı türdeki 1145 adet deniz balığı incelenmiştir. İncelenen balıkların 56 (%4,8)'sında morfolojik olarak 776 adet *Anisakis* tip I larva identifiye edilmiştir. Ege ve Akdeniz'de avlanan kolyoz (*Scomber japonicus*), uskumru (*Scomber scombrus*), bakalyaro (*Micromesistius poutassou*), berlam (*Merluccius merluccius*), dülger (*Zeus faber*), istavrit (*Trachurus mediterraneus*) ve barbunya (*Mullus barbatus*) olmak üzere 7 farklı balık türünde tespit edilen larvaların RFLP ile ITS ve *cox 2* gen bölgelerinin DNA dizi analizleri sonucunda ülkemiz karasularında ilk kez *A. pegreffii*, *A. typica* ve *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip tespit edilmiştir. Aynı araştırmada Karadeniz'de yetiştiriciliği yapılan ve avlanan 16 farklı balık türünde *Anisakis* larvaları ile karşılaşılması (Pekmezci, vd., 2014a).

Ülkemiz karasularında deniz balıkları için av yasağının olduğu dönemlerde Norveç ve Senegal gibi ülkelerden farklı türlerde deniz balıkları Türkiye'ye ithal edilmektedir. Ülkemize Norveç'ten (FAO 27) ithal edilen ve balık tezgâhlarında insan tüketimi için sunulan dondurulmuş Atlantik uskumrularında (*Scomber scombrus*) %25 enfeksiyon oranında ve 19,1 enfeksiyon yoğunluğunda *Anisakis* spp. larvaları tespit edilmiştir. Bu larvaların moleküler analizlerinde zoonoz karakterli *A. simplex* (s.s.) türü olduğu tespit edilmiştir (Pekmezci, 2014). Ayrıca Türkiye pazarlarında Atlantik uskumrularında kaydedilen ilk *A. simplex* (s.s.) bildirimini olduğunu ve bu durumun Türk tüketiciler için bir sağlık riski oluşturabileceğini ifade etmiştir (Pekmezci, 2014). Yine ülkemize Senegal'den (FAO 34.3.12) ithal edilen Senegal barbunu (*Pseudupeneus prayensis*), antenli mercan (*Pagrus caeruleostictus*) ve dülger balığının (*Zeus faber*) parazitolojik incelemeleri yapılmıştır. İncelenen balıklardan sadece dülger balığında %82,5 enfeksiyon oranı ve 8,3 enfeksiyon

yoğunluğunda *Anisakis* spp. larvaları saptanmıştır. Bu larvaların moleküler olarak zoonoz karakterli *A. pegreffii* türü olduğu tespit edilmiştir ve Senegal sularından ithal edilen *Z. faber*'de *A. pegreffii* larvalarının varlığının Türk tüketicilerinde halk sağlığı sorunlarına neden olabileceği vurgulanmıştır (Pekmezci, 2019).

Türkiye'ye ithal edilen (FAO 27) bazı deniz balığı türlerinin tüm balık ve filetoları ile yemeye hazır ithal (FAO 27) ve yerel (Karadeniz, Ege Denizi, Akdeniz) balık ürünlerindeki *Anisakis* larvalarının enfeksiyon oranları, yoğunluğu ve bolluğu araştırılmıştır (Simsek, vd., 2020). Süpermarketler, suşi restoranları ve balık marketlerinden toplam 205 adet yemeye hazır balık ürünü, 100 adet ithal dondurulmuş Atlantik somon (*Salmo salar*) filetosu ve 100 adet ithal dondurulmuş bütün Atlantik uskumrusu (*Scomber scombrus*) incelenmiştir. İncelenen ithal Atlantik uskumrularında %98 enfeksiyon oranında, 6,1 enfeksiyon yoğunluğu ve 6,0 enfeksiyon bolluğunda toplam 602 *Anisakis* tip I larvası tespit edilmiştir. Tüketmeye hazır balık ürünlerinde ve Atlantik somon filetolarında *Anisakis* larvası tespit edilmemiştir. Toplanan larvalar arasından rastgele seçilen 100 adet *Anisakis* larvasının ITS gen bölgesinin RFLP analizleri sonucunda 87'sinin zoonoz karakterli *A. simplex* (s.s.), 13 larvanın ise *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotipi olduğu tespit edilmiştir (Simsek, vd., 2020). Aynı yazarlar tarafından ithal Atlantik uskumrularında %98 oran ile *A. simpleks* (s.s.) larvalarının yüksek oranda bulunduğu ve enfekte ithal uskumruların Türkiye'de ve muhtemelen diğer ülkelerdeki tüketicilerde alerjik anisakiosis olaylarına potansiyel rezervuarlar olduğunun önemini ifade etmişlerdir (Simsek, vd., 2020).

2.3. Lipsoz Balığı Hakkında Genel Bilgiler

Lipsoz balığının (*Scorpaena scrofa* Linnaeus, 1758) sistematikteki yeri aşağıda belirtilmiştir (Turan, 2007; Nunoo, et al., 2015).

Alem	:	Animalia (Hayvanlar)
Şube	:	Chordata (Kordalılar)
Üst Sınıf	:	Osteichthyes (Kemikli balıklar)
Sınıf	:	Actinopterygii
Takım	:	Scorpaeniformes
Aile	:	Scorpaenidae
Cins	:	<i>Scorpaena</i>
Tür	:	<i>Scorpaena scrofa</i> Linnaeus, 1758 (Lipsoz)
Sinonimleri	:	<i>Scorpaena lutea</i> <i>Scorpaena natalensis</i> <i>Scorpaenopsis natalensis</i> <i>Scorpaena barbata</i>

Dünya’da *Scorpaena* cinsine ait 185 tür bulunmaktadır. Ülkemiz karasularında bu cins 7 tür ile temsil edilmektedir (Bilecenoğlu vd., 2014).

- *Scorpaena elongata* Cadenat, 1943 (Kırmızı iskorpit, Saçaklı iskorpit)
- *Scorpaena loppei* Cadenat, 1943
- *Scorpaena maderensis* Valenciennes, 1833 (İskorpit)
- *Scorpaena notata* Rafinesque, 1810 (Benekli iskorpit)
- *Scorpaena porcus* Linnaeus, 1758 (Kahverengi iskorpit)
- *Scorpaena scrofa* Linnaeus, 1758 (Adabeyi, Lipsoz)
- *Pterois miles* (Bennett, 1828)



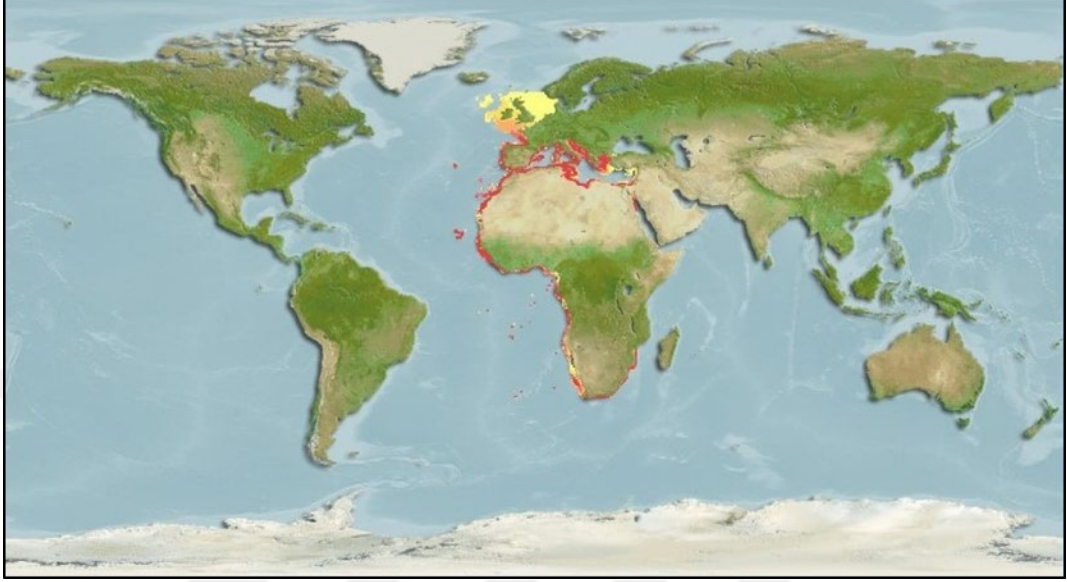
Şekil 2.8. *Scorpaena scrofa* (L.) türünün genel görünüşü

Lipsoz ya da diğer adı ile Adabeyi Scorpaenidae ailesinde yer alan ticari değeri oldukça yüksek ve eti lezzetli olan kemikli bir balık türüdür. Vücut rengi tuğla kırmızından açık pembeye kadar değişim gösterir. Deri üzerinde daha koyu renkte nokta ve çizgiler bulunmaktadır. Vücut oranına göre kafası büyüktür. Baş kısmında dikenler ile girinti ve çıkıntılar bulunmaktadır. Sırt, karın ve anal yüzgeçleri sert ışın yapısındadır ve zehir kanalları içermektedir (Turan, 2007; Bat vd., 2008) (Şekil 2.8). Lipsozlar 50–60 cm boya ve 4–5 kg ağırlığa kadar büyüyebilmektedir. Sıcak ve ılık denizlerimizin sahil kıyılarından 1000 m’ye kadar inen derinliklerde bitkilerle örtülü, taşlık, çakıllı ve kumlu düzeylerde tek başına yaşarlar. Derinlikte kayalar ve algler arasında yaygın olarak bulunan yerleşik bir türdür (Maricchiolo, et al., 2014). Gonadlara bakılarak cinsiyet tayini yapılmaktadır. Erkeklerde gonadlar beyaz renkli ve ince uzun bir yapıda iken dişilerde pembemsi turuncu renkte ve yumurtaları sayılabilir nitelikte kese şeklinde gonadlara sahiptir (Arslan, 2017).

Lipsozların beslenme alışkanlıklarının bileşimlerini anlamak için yapılan mide içerik analizlerinde esas olarak küçük kemikli balıklar ile Crustacea, Cephalopoda, Isopoda, Amphipoda, Decapoda gibi canlıları avlayan bentik karakterde (sahilden itibaren en derin bölgelere kadar uzanabilen dip bölgede yaşayan) özel bir tür olduğu görülmüştür (Cabiddu, et al., 2010; Šantić, et al., 2011).

Bu tür geniş bir dağılıma sahiptir. Doğu Atlantik'te, Cape Verde Adaları da dahil olmak üzere güneydeki Britanya Adaları'ndan Senegal'e kadar uzanır. Ayrıca Angola ve Güney Afrika dışında Somali'de bulunur. Akdeniz'de bu tür geniş çapta

dağılmıştır. Akdeniz'de ticari bir türdür ve ana yakalama yöntemi troller, solungaç ağları, trammel ağları ve uzun hatlardır (Nunoo, et al., 2015). Ülkemiz karasularından Marmara Denizi, Akdeniz ve Ege Denizi'nde yaygın olarak rastlanmaktadır (Turan, 2007).



Şekil 2.9. *Scorpaena scrofa* (L.) türünün coğrafik dağılımı (Froese and Pauly, 2021)

3. MATERYAL METOT

3.1. Materyal

Araştırmada Ege Denizi'nde (FAO 37.3.1) avlanan ve balıkçı tezgâhlarında satışa sunulan toplam 272 adet lipsoz (*Scorpaena scrofa* Linnaeus, 1758) balığı temin edilmiştir. Tedarikçilerden lipsoz balıkları satın alınırken Ege Denizi'nden avlananlar araştırmaya dahil edilmiştir. Lipsoz balıkları Samsun İli'nde Metro Market ile İzmir Büyükşehir Belediyesi Balık Hali'ndeki tedarikçilerden Mart 2019–Kasım 2020 tarihleri arasında taze olarak satın alınmıştır (şekil 3.1).



şekil 3.1. Balık tezgahlarında satışa sunulan lipsoz balığı *Scorpaena scrofa* (L.)

3.2. Metot

3.2.1. Lipsoz Balıklarının Parazitolojik Muayenesi

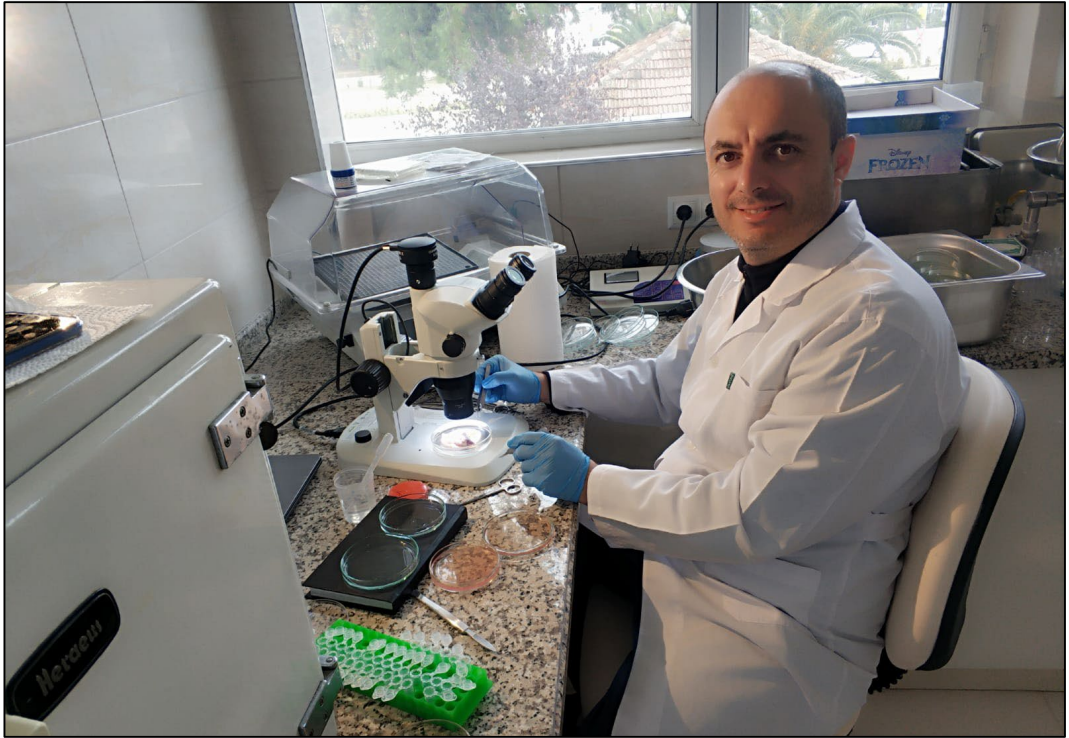
Lipsoz balıklarının parazitolojik muayeneleri yapılmadan önce total boyları cetvel ile ölçülerek cm, ağırlıkları hassas terazi ile ölçülerek gr cinsinden kaydedilmiştir (Şekil 3.2). Lipsoz balıklarının her birinin ayrı ayrı nekropsileri ve parazitolojik muayeneleri yapılmıştır. Balıkların karın duvarı iç organlar zedelenmeden anüsten itibaren başın alt kısmına kadar ince uçlu makas yardımı ile kesilmiştir (Şekil 3.3). İç organların yüzeyleri ve karın boşluğu nematod larvaları yönünden çıplak gözle ve steromikroskop altında farklı büyütme altlarında incelenmiştir. Takiben balıkların sindirim sistemi ve iç organlar dışarı çıkarılmış ve içinde 1:5 oranında musluk suyu içeren 1 litrelik kapaklı kaplar içerisine alınarak oda sıcaklığında sabit bir pozisyonda bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında kaplar içerisinden organlar çıkarıldıktan sonra üst kısımdaki sıvı dökülmüş ve dip kısımdaki sıvı steromikroskop altında nematod larvaları yönünden incelenmiş ve larvalar toplanmıştır (Shamsi and Suthar, 2016) (Şekil 3.4). Sonrasında sindirim sistemi ve iç organları çıkarılmış olan lipsozun kafası kesilmiş ve ana omurgası kas dokularından dikkatli bir şekilde sıyrıldıktan sonra kas dokuları sağ ve sol parça olmak üzere iki filetoya ayrılmıştır. Sonrasında her bir fileto 4 eşit parçaya bölünmüştür. Bölünmüş her bir parça bir bıçak yardımı ile daha ince filetolar haline getirilmiştir. Aynı parçaya ait olan inceltilmiş filetolar beyaz ışık altında *Anisakis* larvalarının varlığı yönünden incelenmiştir (EFSA, 2010; Cipriani, et al., 2016; Levsen, et al., 2018) (Şekil 3.5).



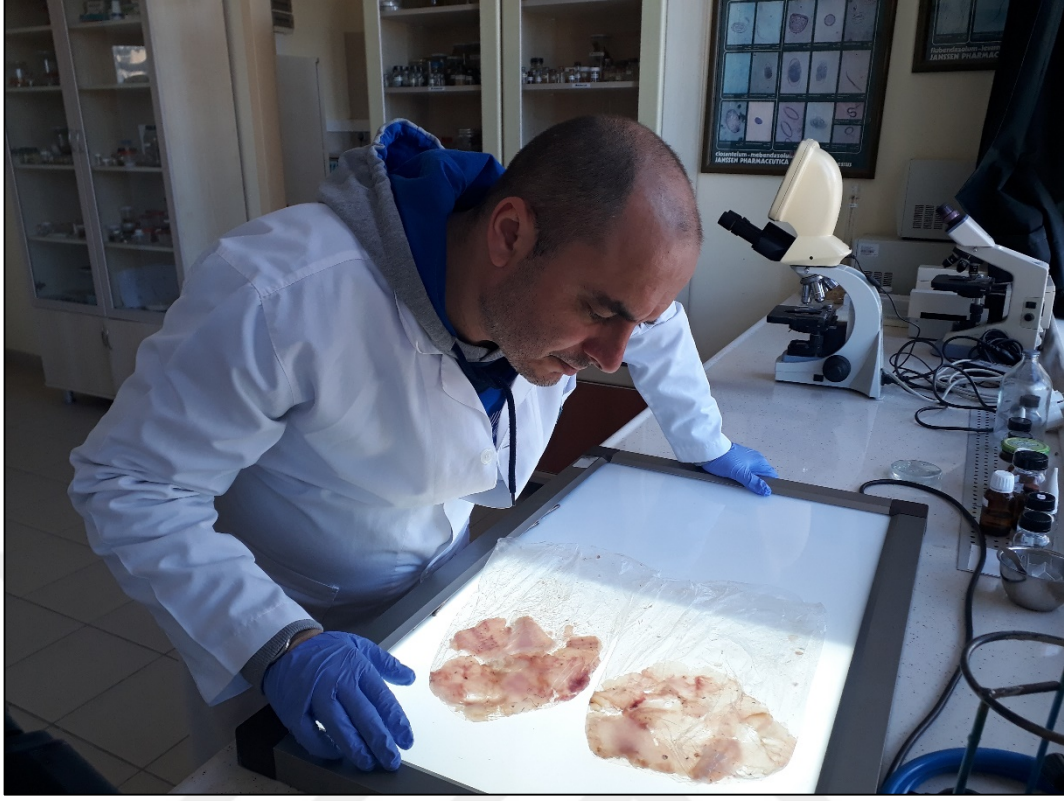
Şekil 3.2. Lipsoz balığı *Scorpaena scrofa* (L.)



Şekil 3.3. Lipsozların nekropsi ve parazitolojik muayenesi



Şekil 3.4. Lipsoz balıklarından nematod larvalarının toplanması



Şekil 3.5. Lipsoz balıklarının kas dokularının nematod larvaları yönünden muayenesi

3.2.2. *Anisakis* spp. Larvalarının Morfolojik İdentifikasyonu

Araştırma esnasında bulunan nematod larvaları tek tek toplanmış, sayılmış ve distile su altında temizlenerek %70'lik sıcak etanolde tespit edilmiştir. Alkolde tespit edilen larvalar tek tek olacak şekilde ve her seferinde bisturi ucu değiştirmek koşulu ile üç eşit parçaya ayrılmıştır. Larvaların ön ve arka parçalarından morfolojik identifikasyon yapılırken, orta kısımları moleküler analizler için kullanılmıştır. Larvaların ön ve arka uçları laktofenolde (fenol, laktik asit, gliserin, su=2:1:1:1 oranı) 1–2 gün şeffaflandırılmıştır. Daha sonra larvalar ışık mikroskobuna (Leica DM 2500 LED) bağlı dijital kamera sistemi (Leica MC 190 HD) yardımı ile görüntülenmiş ve morfometrik ölçümleri yapılarak larval morfolojileri teşhis edilmiştir (Berland, 1961; Petter and Maillard, 1988). Larvaların morfometrik ölçümleri ortalama değer (en küçük ölçüm değeri–en büyük ölçüm değeri) şeklinde verilmiştir.

3.2.3. *Anisakis* spp. Larvalarının Enfeksiyon Parametreleri

Araştırmada morfolojik olarak tanımlanmış *Anisakis* spp. larvalarının enfeksiyon oranı, enfeksiyon yoğunluğu ve enfeksiyon bolluğu Rózsa, et al., (2000)'nın belirttiği şekilde hesaplanmıştır.

Enfeksiyon Oranı: Parazit ile enfekte konak sayısının incelenen tüm konak sayısına oranıdır. Yüzde olarak ifade edilir.

Enfeksiyon Yoğunluğu: Enfekte konakta bulunan parazit türünün toplam sayısının aynı parazit türü ile enfekte konak sayısına oranıdır. Sayı ile ifade edilir.

Enfeksiyon Bolluğu: Enfekte konakta bulunan parazit türünün toplam sayısının incelenen toplam konak sayısına (enfekte ve enfekte olmayan) oranıdır. Sayı ile ifade edilir.

3.2.4. *Anisakis* spp. Larvalarının Genomik DNA İzolasyonu

Morfolojik tanımlamada cins düzeyinde *Anisakis* spp. (= *Anisakis* tip I larva) olarak teşhis edilen larvaların moleküler tanımlamaları için her birinin ayrı ayrı orta parçalarının gDNA izolasyonları yapılmıştır. DNA izolasyonları GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific™) yardımı ile kit protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Larvaların gDNA'ları PZR analizleri yapılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.5. *Anisakis* spp. Larvalarının ITS Gen Bölgesinin PZR Analizleri

Morfolojik incelemelerde *Anisakis* spp. olarak teşhis edilen tüm larvaların gDNA'ların rDNA ITS (ITS-1, 5.8S, ITS-2) gen bölgesi NC5 (5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3') ve NC2 (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT-3') primerleri kullanılarak PZR analizleri yapılmıştır (Zhu, et al., 1998). Her bir gen bölgesinin PZR ile çoğaltılması için gDNA, PZR Master Mix ile ileri ve geri yönlü primerler kullanılarak PZR karışımı hazırlanmıştır. ITS gen bölgesi için PZR karışımı 50 µl toplam hacimde olmak üzere 10 µl gDNA, 25 µl 2X DreamTaq™ Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific™), 0,5 µl 100 µM konsantrasyonda NC5 primeri, 0,5 µl 100 µM konsantrasyonda NC2 primeri ve 14 µl nükleaz içermeyen su (Thermo Scientific™) olacak şekilde hazırlanmıştır. PZR karışımı termal siklus cihazına yerleştirilmiş ve amplifikasyon koşulları Pekmezci, vd., (2014)'de belirtilen protokollere göre

yapılmıştır. Sonrasında amplifiye PZR ürünleri etidyum bromid (Thermo Scientific™) ile boyanmış %1,5 agaroz jelde 100 V'da 80 dk yürütülmüş ve sonrasında jel görüntüleme cihazında UV altında DNA bantlarının varlığı görüntülenmiştir.

3.2.6. *Anisakis* spp. Larvalarının RFLP Analizleri

PZR amplifikasyonda başarılı olan tüm larvaların ITS gen bölgesinin PZR ürünleri *Hha* I (Thermo Scientific™) ve *Hinf* I (Thermo Scientific™) enzimleri kullanılarak RFLP tekniği ile kesilmiştir (D'Amelio, et al., 2000; Abollo, et al., 2003; Pontes, et al., 2005). Her iki enzim için ayrı ayrı olacak şekilde RFLP karışımları kit içinden çıkan protokollere göre hazırlanmıştır. *Hha* I enzimi için RFLP karışımı 10 µl ITS PZR ürünü, 1 µl *Hha* I enzimi, 2 µl 10X Buffer Tango ve 16 µl nükleaz içermeyen su (Thermo Scientific™) olacak şekilde hazırlanmıştır. *Hinf* I enzimi için RFLP karışımı 10 µl ITS PZR ürünü, 1 µl *Hinf* I enzimi, 2 µl 10X Buffer R ve 16 µl nükleaz içermeyen su (Thermo Scientific™) olacak şekilde hazırlanmıştır. Her iki RFLP karışımı kesim işlemi için 37°C 'de 1 gece kuru blok ısıtıcısında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası RFLP ürünleri etidyum bromid (Thermo Scientific™) ile boyanmış %1,5'luk agaroz jelde 100 V'da 80 dk elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez sonrasında agaroz jel görüntüleme cihazında incelenmiş ve jelin fotoğrafları çekilmiştir. Her bir *Anisakis* larvasının RFLP tekniği ile elde edilen bant profilleri/büyüklikleri dikkate alınarak tür ayrımları ilgili literatürlere göre yapılmıştır (D'Amelio, et al., 2000; Abollo, et al., 2003; Pontes, et al., 2005).

3.2.7. *Anisakis* spp. Larvalarının Cox 2 Gen Bölgesinin PZR Analizleri

ITS gen bölgesinin RFLP analizleri ile tür teşhisi yapılan *A. ziphidarum* türünden 4, *A. typica* ve *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hibrit genotipten 3 ve *A. pegreffii* türleri arasından rastgele seçilen 2 larvanın mtDNA *cox 2* gen bölgesi 211 (5'-TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTTYAT-3') ve 210 (5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3') primerleri kullanılarak PZR analizleri yapılmıştır (Nadler ve Hudspeth, 2000). *Cox 2* gen bölgesi için PZR karışımı 50 µl toplam hacimde olmak üzere 10 µl gDNA, 25 µl 2X DreamTaq™ Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific™), 0,5 µl 100 µM konsantrasyonda 211 primeri, 0,5 µl 100 µM konsantrasyonda 210 primeri ve 14 µl nükleaz içermeyen su (Thermo Scientific™) olacak şekilde hazırlanmıştır. PZR karışımı termal siklus cihazına

yerleştirilmiş ve amplifikasyon koşulları Pekmezci, vd., (2014)'de belirtilen protokollere göre yapılmıştır. Sonrasında amplifiye PZR ürünleri etidyum bromid (Thermo Scientific™) ile boyanmış %1,5 agaroz jelde 100 V'da 80 dk yürütülmüş ve sonrasında jel görüntüleme cihazında UV altında DNA bantlarının varlığı görüntülenmiştir.

3.2.8. *Anisakis* spp. Larvalarının *Cox 2* Gen Bölgesinin DNA Dizi ve Filogenetik Analizleri

RFLP tekniği ile tür bazında identifiye edilen *Anisakis* larvaları arasından her bir tür için rastgele seçilen örneklerin tür doğrulaması için *cox 2* gen bölgesinin DNA dizi analizleri yapılmıştır. PZR amplifikasyonda başarılı olan *cox 2* gen bölgesinin PZR ürünlerinin saflaştırılması ve 211–210 primer çiftleri ile iki yönlü DNA dizi analizleri hizmet alımı karşılığında özel bir firmaya (BM Laboratuvar Sistemleri, Ankara) yaptırılmıştır.

İki yönlü DNA dizisi belirlenen izolatların *cox 2* gen bölgelerinin nükleotid baz dizilerini gösteren kromotogramların kalite skorları Geneious R11 (Kearse, et al., 2012) ve Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen) programları ile analiz edilmiştir. Kromotogramların kalite skorlarının belirlenmesinde Phred skoru 20'nin ($Q \geq 20$) üzerinde olan nükleotid bazları dikkate alınmıştır (Ewing and Green, 1998; Ewing, et al., 1998). Her bir izolata ait olan ileri ve geri yönlü DNA dizilerin kendi aralarında birleştirmeleri Geneious R11 (Kearse, et al., 2012) ve Vector NTI Advance 11.5 (Invitrogen) programları ile yapılmış ve her bir izolat için ortak bir nükleotid dizisi elde edilmiştir. İzolatlara ait ortak dizilerin GenBank veri tabanında BLAST analizleri (Altschul, et al., 1997) yapılarak araştırmada teşhis edilen *Anisakis* türlerinin GenBank'a daha önce kaydedilen diğer *Anisakis* türleri ile aralarındaki benzerlik yüzdeleri belirlenmiştir. Sonrasında GenBank veri tabanına daha önce kaydedilen *Anisakis* türleri için geçerli ve bilimsel makale olarak yayınlanmış olan *cox 2* nükleotid dizileri tespit edilmiş ve filogenetik analizlerde kullanılmıştır.

Bu araştırmada tespit edilen *Anisakis* türleri ile daha önce GenBank veri tabanına kaydedilen diğer *Anisakis* türlerinin *cox 2* gen bölgelerinin çoklu hizalamaları ClustalW algoritması (Thompson, et al., 1994) kullanılarak BioEdit programı ile yapılmıştır (Hall, 1999). Çoklu dizi hizalamasından belirsiz şekilde ya da oldukça farklı hizalanan nükleotidler “daha az katı seçim” seçeneği işaretlenerek

Gblocks 0.91b programı kullanılarak kaldırılmıştır (Castresana, 2000).

Anisakis türlerinin *cox 2* gen bölgelerinin genetik uzaklıkları (p-distance) Kimura-2-Parameter modeli (tek tip oranlar ve %95'lik kısmi silme) kullanılarak MEGA X programı ile hizalanmış diziler üzerinden hesaplanmıştır (Kumar, et al., 2018). Aynı zamanda *cox 2* gen bölgesinin filogenetik ağaçları ML metodu ve HKY+G+I modeli kullanılarak 100 tekrarlı olarak MEGA X programı ile oluşturulmuştur (Kumar, et al., 2018). Filogenetik ağaç oluşturulurken HKY+G+I modeli "Find Best DNA/Protein Models" basamağı kullanılarak ve en düşük AIC değeri dikkate alınarak MEGA X programında saptanmıştır (Kumar, et al., 2018). Filogenetik ağaçta iç düğümlerde ön yükleme değerleri (≥ 70) rapor edilmiş (Hillis and Bull, 1993) ve dış grup olarak *Pseudoterranova ceticola* (DQ116435) kullanılmıştır.

Bu araştırmada *cox 2* gen bölgesi karakterize edilen *Anisakis* türlerinin GenBank kayıtları yapılmış ve erişim numaraları alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *Anisakis* spp. Larvalarının Morfolojisi ve Enfeksiyon Parametreleri

Nekropsileri yapılan 272 adet lipsoz balığı 26–722 gr ağırlığında ve 12,4–34,9 cm boyları arasında belirlenmiştir. Parazitolojik incelemesi yapılan 272 adet lipsozun 26'sı *Anisakis* spp. larvaları ile enfekte bulunmuş ve enfeksiyon oranının %9,6 olarak tespit edilmiştir. *Anisakis* spp. larvalarının enfeksiyon yoğunluğu 2,8 (1–21 larva) ve enfeksiyon bolluğu 0,2 olarak saptanmıştır.

Lipsozlardan toplam 74 adet *Anisakis* spp. larvası karın boşluğu, iç organların yüzeyi ve mezenteriyumdan toplanmıştır. İncelenen kas dokularında *Anisakis* spp. larvaları ile karşılaşılması (Şekil 4.1–4.3).

Morfolojik teşhis anahtarları ışığında yapılan parazitolojik incelemeler sonrasında nematod larvalarının ön uçlarında tek larval diş olması, ventriküler yapının tek parça bütün şekli, boşaltım deliğinin ön uçta dudakların hemen alt kısmında dışarı açılması ve kuyruk ucunda tek diken benzeri (mukron) yapının olması nedeniyle üçüncü dönem *Anisakis* tip I larva olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.4–4.7).

Anisakis tip I larvaların (n=10) vücut uzunluğu 2,6 (2,0–3,2) cm ve genişliği 259 (152–301) µm'dir. Özofagus uzunluğu 1646 (1292–2630) µm'dir. Ventrikül 565 (314–784) µm uzunluğundadır. Kuyruk uzunluğu 125 (97–180) µm'dir (Şekil 4.4–4.7).

Lipsozların parazitolojik incelemeleri sonucunda Raphidascarididae ailesinden *Hysterothylacium* spp. larvaları ile de karşılaşılması.



Şekil 4.1. Lipsoz balığının karın boşluğundaki *Anisakis* spp. larvaları (a)



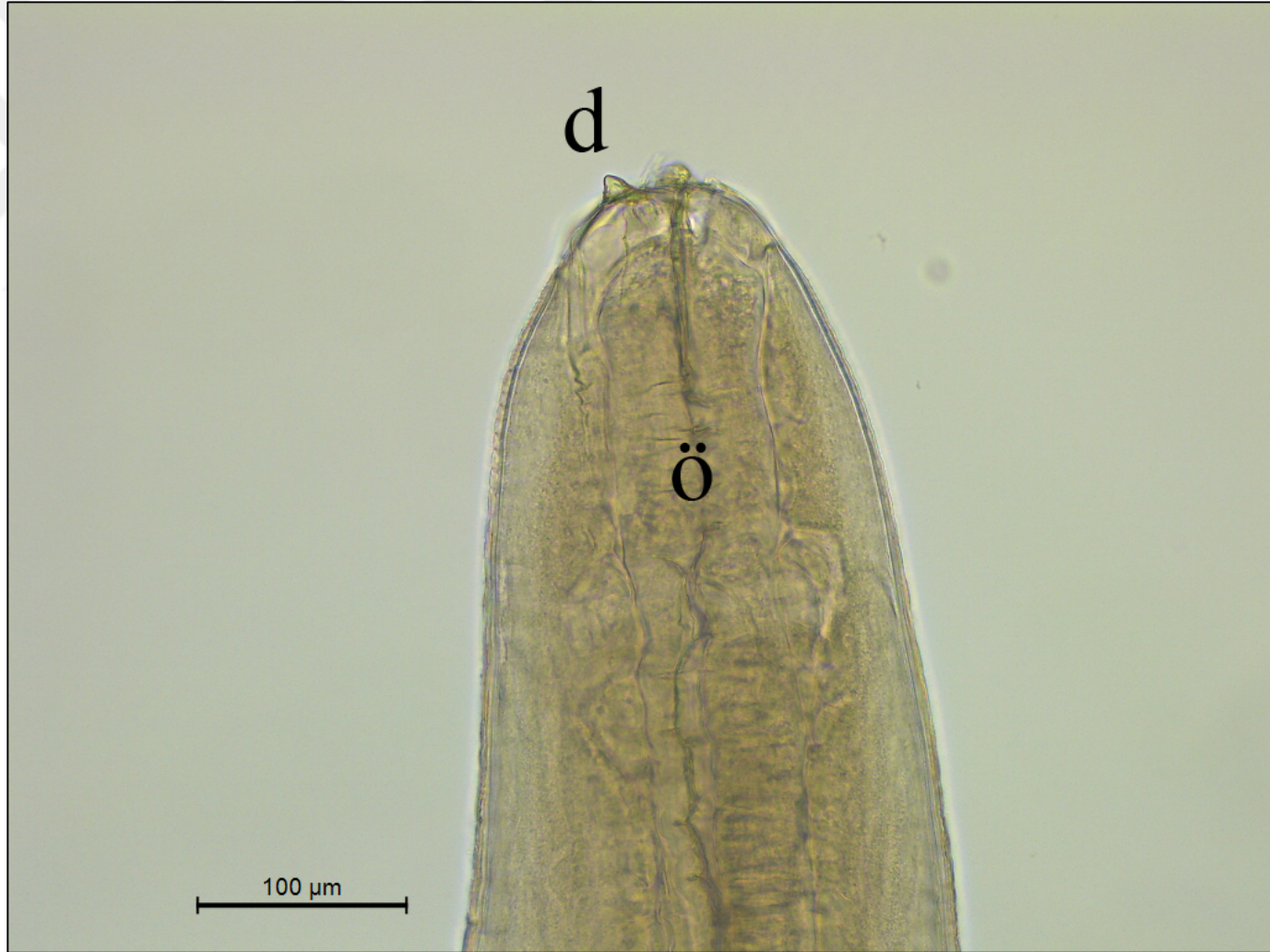
Şekil 4.2. Lipsoz balığının karın boşluğundaki *Anisakis* spp. larvaları (b)



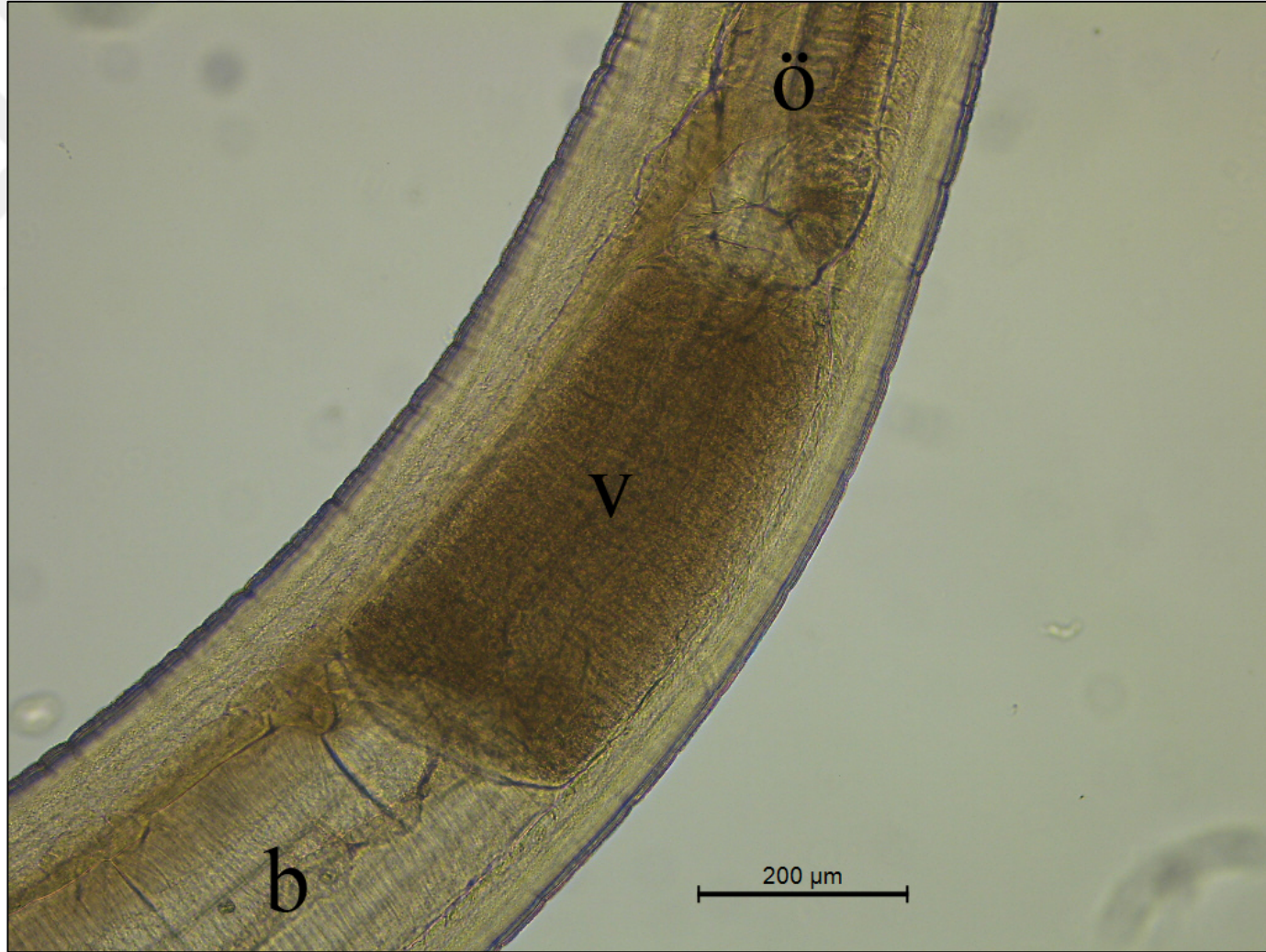
Şekil 4.3. Lipsoz balığının mezenteriyumundaki *Anisakis* spp. larva topluluğu



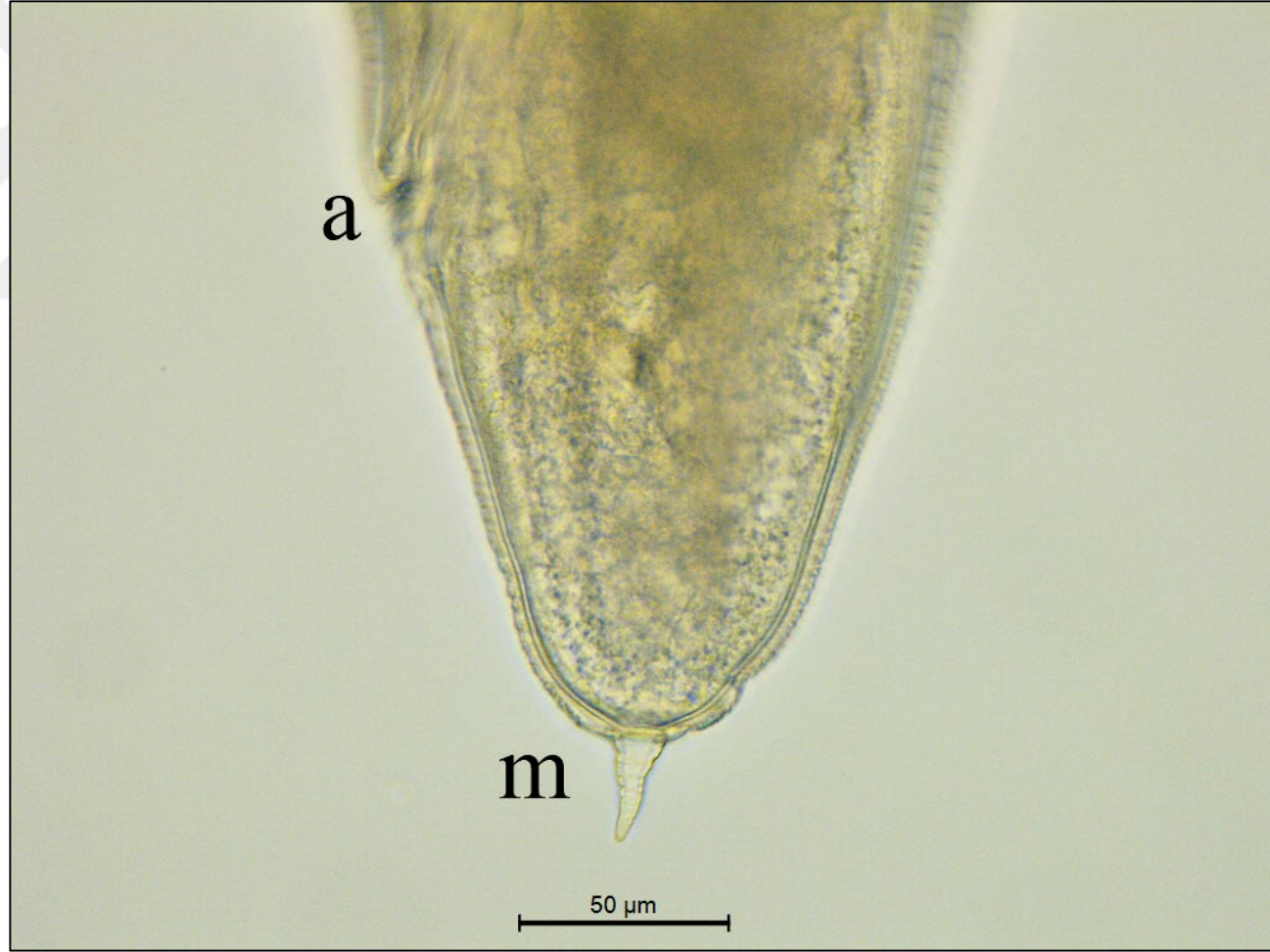
Şekil 4.4. *Anisakis* tip I larva (üçüncü dönem) ön parça. ö: özofagus, v: ventrikülüs, skala: 500 µm



Şekil 4.5. *Anisakis* tip I larva (üçüncü dönem) ön uç. **d**: diş, **ö**: özofagus, skala: 100 µm



Şekil 4.6. *Anisakis* tip I larva (üçüncü dönem) ventrikül bölgesi. **b**: barsak, **ö**: özofagus, **v**: ventrikül, skala: 200 µm



Şekil 4.7. *Anisakis* tip I larva (üçüncü dönem) arka uç. **a**: anüs, **m**: mukron, skala: 50 µm

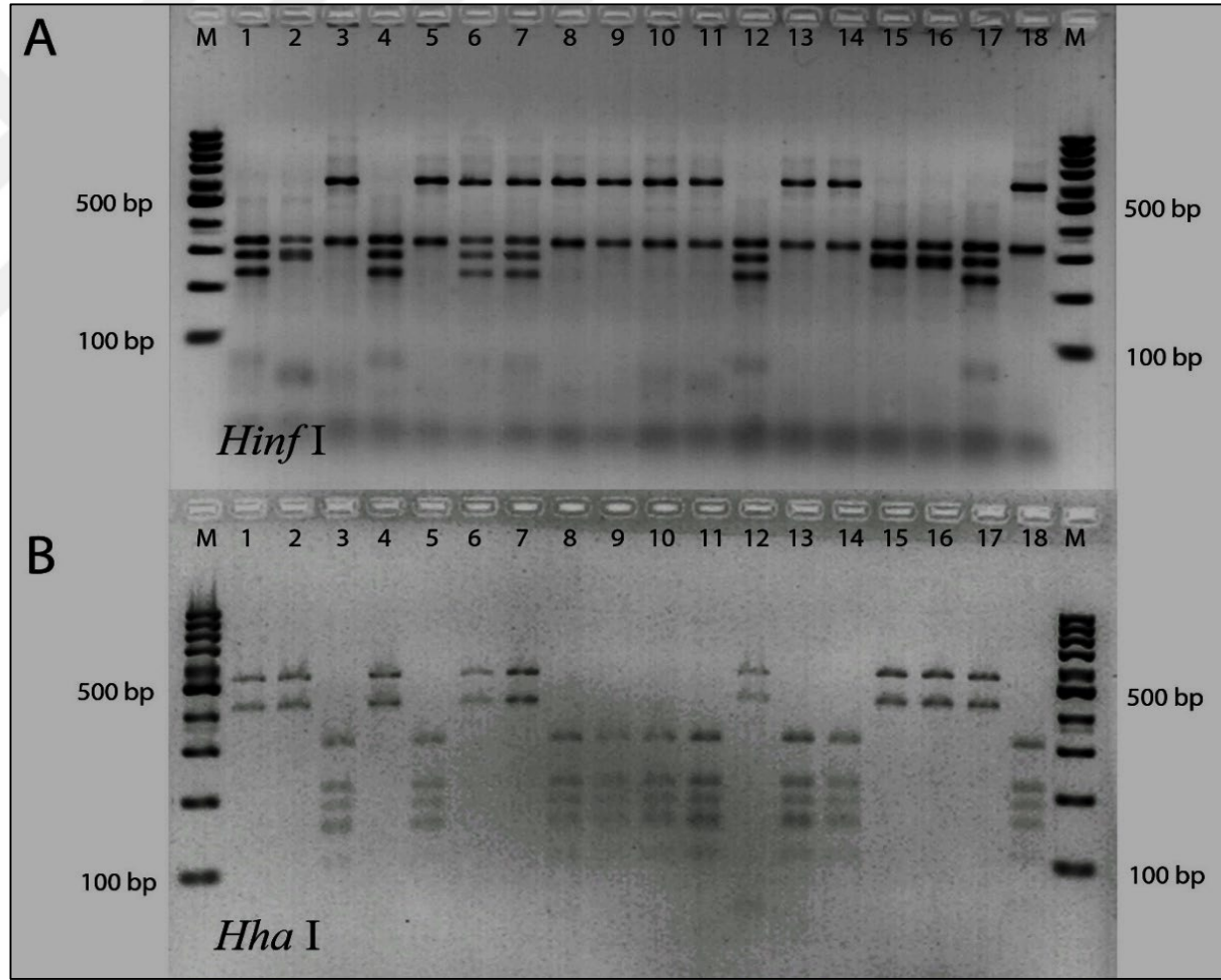
4.2. *Anisakis* spp. Larvalarının ITS Gen Bölgesinin PZR ve RFLP Sonuçları

Toplam 74 adet larvanın ITS gen bölgesi ~1000 baz büyüklüğünde olmak üzere başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. PZR analizleri ile amplifiye edilen ITS ampliconları *Hinf*I ve *Hha* I kesim enzimleri kullanılarak RFLP tekniği ile başarılı bir şekilde kesilmiş ve farklı büyüklükte DNA bant profilleri elde edilmiştir.

Anisakis tip I larvalarının ITS gen bölgesi *Hinf*I enzimi ile kesildiğinde 74 adet larvanın 37'si *A. pegreffii* ile uyumlu olan ~370, ~300 ve ~250 baz büyüklüğünde üç DNA bant profili, 22'si *A. typica* ile uyumlu olan ~620 ve ~350 baz olmak üzere iki DNA bant profili, 11'i *A. ziphidarum* ile uyumlu olan ~370, ~320 ve ~290 baz büyüklüğünde üç DNA bant profili ve 4'ü ~620, ~370, ~300 ve ~250 baz büyüklüğünde olmak üzere *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hibrit genotip ile uyumlu dört DNA bant profili tespit edilmiştir (Şekil 4.8A).

Anisakis tip I larvalarının ITS gen bölgesi *Hha* I enzimi ile kesildiğinde 74 adet larvanın 52'si *A. pegreffii*, *A. ziphidarum* ve *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hibrit genotip ile uyumlu olan ~550 ve ~430 baz büyüklüğünde iki DNA bant profili, 22'si *A. typica* ile uyumlu olan ~320, ~240, ~180 ve ~160 baz büyüklüğünde olmak üzere 4 DNA bant profili tespit edilmiştir (Şekil 4.8B).

RFLP analizleri sonucunda DNA bant profilleri dikkate alınarak 74 adet larvanın moleküler olarak 37 (%50) 'si *A. pegreffii*, 22 (%29,7) 'si *A. typica*, 11 (%14,9) 'i *A. ziphidarum* ve 4 (%5,4) 'ü *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hibrit genotip olarak teşhis edilmiştir.



Şekil 4.8. ITS gen bölgesinin *Hinf* I (A) ve *Hha* I (B) enzimleri ile kesildiğinde elde edilen DNA bant profilleri. **M:** DNA Merdiveni, **1, 4, 12, 17:** *A. pegreffii*; **3, 5, 8-11, 13, 14, 18:** *A. typica*; **2, 15, 16:** *A. ziphidarum*; **6, 7:** *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii*

4.3. *Anisakis* spp. Larvalarının *Cox 2* Gen Bölgesinin PCR ve DNA Dizi Analiz Sonuçları

ITS gen bölgesinin RFLP analizleri sonucunda tür teşhisi yapılan *A. ziphidarum* türünden 4, *A. typica* ve *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hibrit genotipten 3 ve *A. pegreffii* türleri arasından rastgele seçilen 2 larvanın *cox 2* gen bölgeleri ~600 baz büyüklüğünde başarılı bir şekilde PZR analizleri ile çoğaltılmıştır.

Toplam 12 larvanın (4 *A. ziphidarum*, 3 *A. typica*, 3 *A. simplex* x *A. pegreffii*, 2 *A. pegreffii*) *cox 2* gen bölgelerinin yapılan DNA dizi analizleri sonucunda 582 baz uzunluğunda DNA dizileri elde edilmiştir ve GenBank erişim numaraları alınmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. *Anisakis* türlerinin *cox 2* gen bölgelerinin GenBank erişim numaraları

<i>Anisakis</i> türü	İzolat No	GenBank erişim numarası
<i>A. ziphidarum</i>	28	MZ297324
<i>A. ziphidarum</i>	39	MZ297325
<i>A. ziphidarum</i>	45	MZ297326
<i>A. ziphidarum</i>	47	MZ297327
<i>A. typica</i>	16	MZ297328
<i>A. typica</i>	17	MZ297329
<i>A. typica</i>	27	MZ297330
<i>A. simplex</i> (s.s.) x <i>A. pegreffii</i>	34	MZ297331
<i>A. simplex</i> (s.s.) x <i>A. pegreffii</i>	37	MZ297332
<i>A. simplex</i> (s.s.) x <i>A. pegreffii</i>	40	MZ297333
<i>A. pegreffii</i>	30	MZ297334
<i>A. pegreffii</i>	56	MZ297335

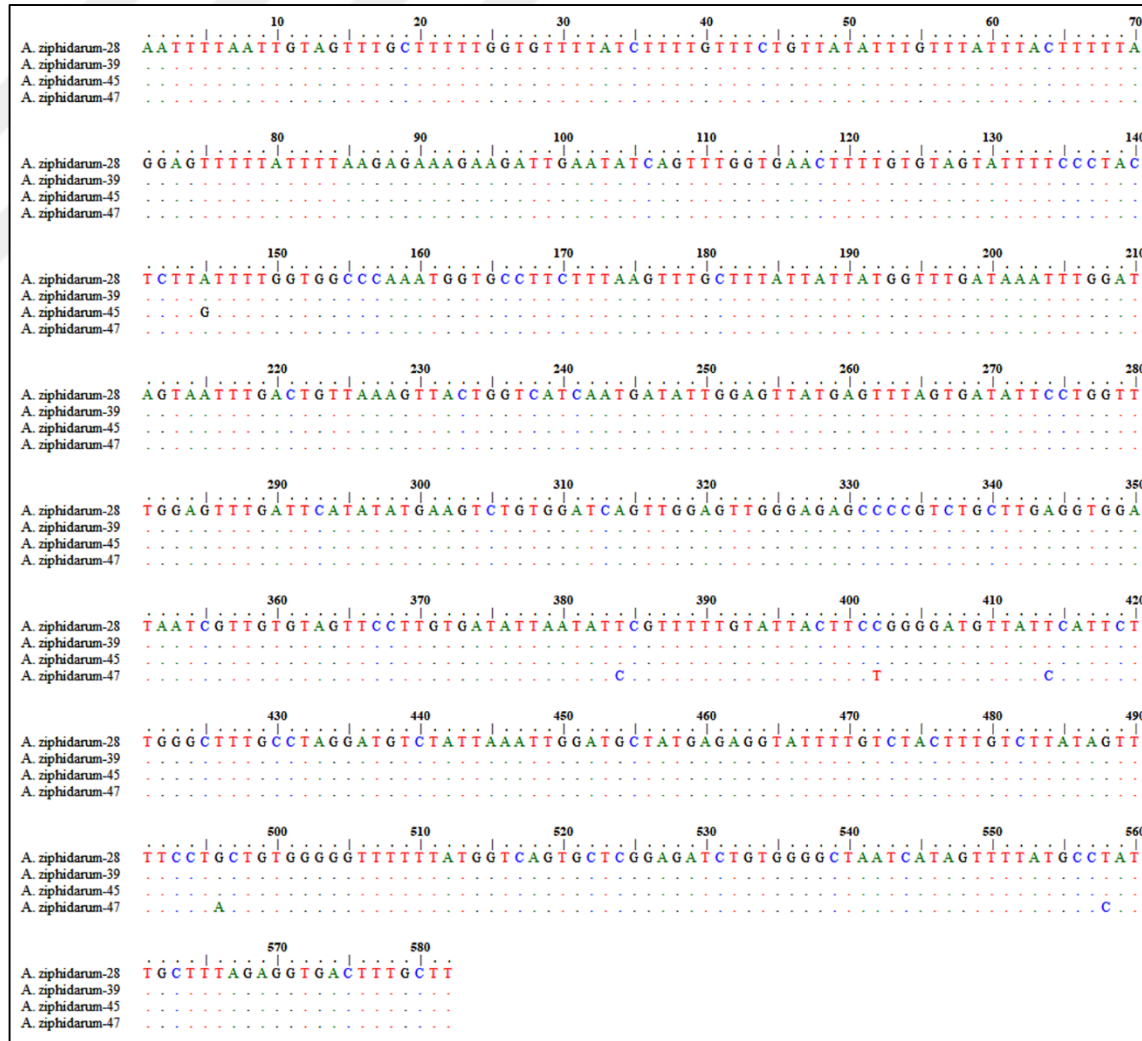
4.4. *Anisakis* spp. Larvalarının Cox 2 Gen Bölgesinin Filogenetik Analizleri

Anisakis ziphidarum türünün 28, 39, 45 ve 47 no'lu 4 izolatin *cox 2* gen bölgeleri arasında nükleotid farklılıkları saptanmıştır (Şekil 4.9). Üçüncü dönem *A. ziphidarum* larvalarına ait 4 izolatin (28, 39, 45, 47) *cox 2* gen bölgelerinin BLAST analizleri sonrasında Atlas Okyanusu'nun Güney Afrika kıyılarından izole edilen erişkin *A. ziphidarum* (DQ116430) türünün referans dizisi ile %98,97 – %100 oranında benzerlik tespit edilmiştir.

Anisakis typica türünün 16, 17 ve 27 no'lu 3 izolatin *cox 2* gen bölgeleri arasında nükleotid farklılıkları saptanmıştır (Şekil 4.10). Üçüncü dönem *A. typica* larvalarına ait 3 izolatin (16, 17, 27) *cox 2* gen bölgelerinin BLAST analizleri sonrasında Atlas Okyanusu'nun Güney Afrika kıyılarından izole edilen erişkin *A. typica* (DQ116427) türünün referans dizisi ile %98,80 – %99,31 oranında benzerlik tespit edilmiştir.

Anisakis simplex (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotipin 34, 37 ve 40 no'lu 3 izolatin *cox 2* gen bölgeleri arasında nükleotid farklılıkları saptanmıştır (Şekil 4.11). Üçüncü dönem *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* larvalarına ait 3 izolatin (34, 37, 40) *cox 2* gen bölgelerinin BLAST analizleri sonrasında Ege Denizi'nin Türkiye kıyılarından (KF032057, KF032059, KF032061) izole edilen üçüncü dönem *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* larvası ile %95,83 – %99,31 oranında benzerlik tespit edilmiştir.

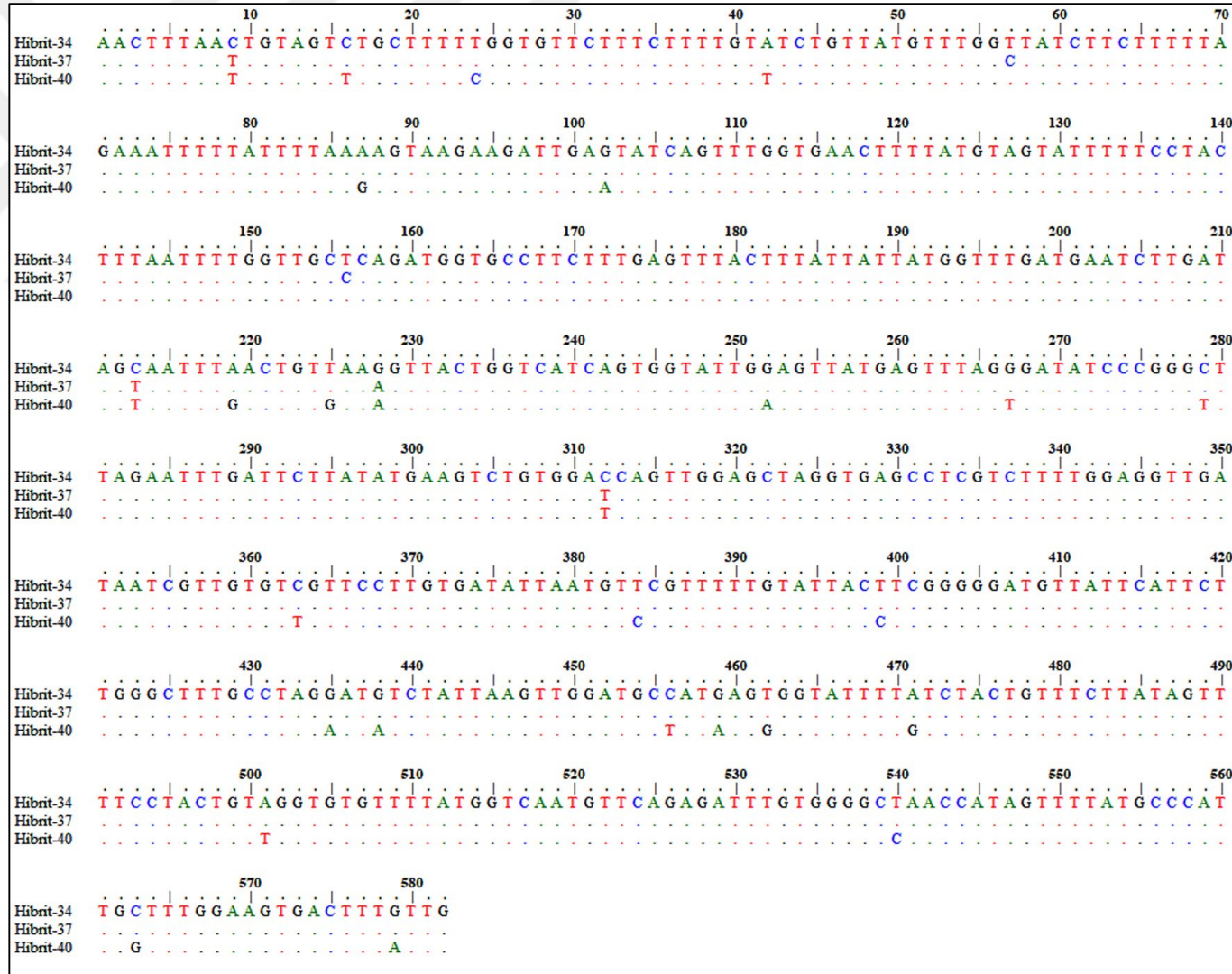
Anisakis pegreffii türünün 30 ve 56 no'lu 2 izolatin *cox 2* gen bölgeleri arasında nükleotid farklılıkları saptanmıştır (Şekil 4.12). Üçüncü dönem *A. pegreffii* larvalarına ait 2 izolatin (30, 56) *cox 2* gen bölgelerinin BLAST analizleri sonrasında Atlas Okyanusu'nun İspanya kıyılarından (DQ116428) izole edilen erişkin *A. pegreffii* türünün referans dizisi %97,77 – %99,48 oranında benzerlik tespit edilmiştir.



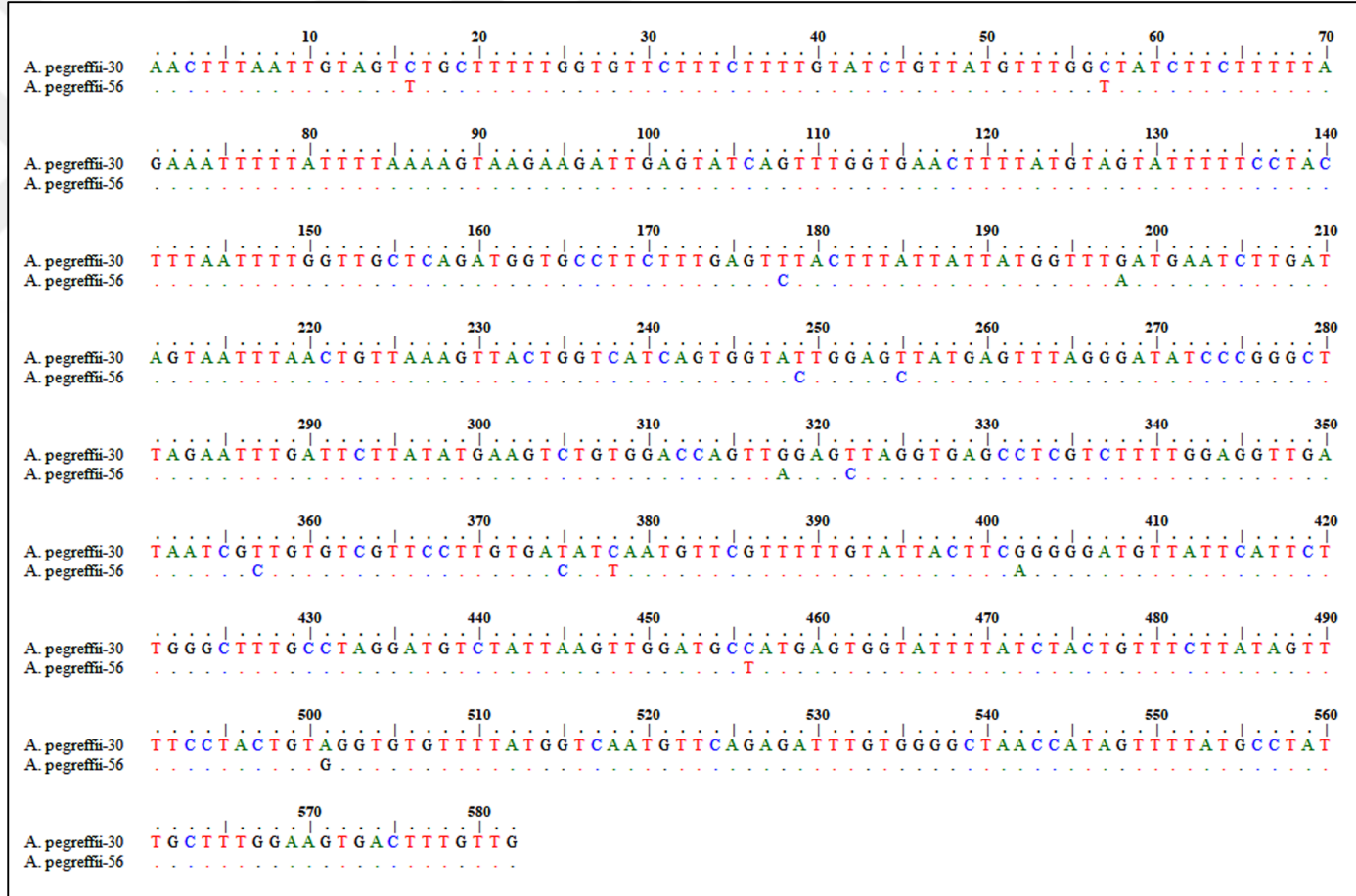
Şekil 4.9. *Anisakis ziphidarum* izolatlarının (28, 39, 45, 47) *cox 2* genleri arasındaki nükleotid farklılıkları



Şekil 4.10. *Anisakis typica* izolatlarının (16, 17, 27) *cox 2* genleri arasındaki nükleotid farklılıkları



Şekil 4.11. *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotipin izolatlarının (34, 37, 40) *cox 2* genleri arasındaki nükleotid farklılıkları



Şekil 4.12. *Anisakis pegreffii* izolatlarının (30, 56) *cox 2* genleri arasındaki nükleotid farklılıkları

Anisakis ziphidarum türünün 28, 39, 45 ve 47 no'lu izolatlarının *cox 2* gen bölgeleri arasındaki genetik uzaklığın (p-distance) %0,00 – %1,04 arasında olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2).

Anisakis typica türünün 16, 17 ve 27 no'lu izolatlarının *cox 2* gen bölgeleri arasındaki genetik uzaklığın (p-distance) %1,04 – %1,92 arasında olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2).

Anisakis simplex x *A. pegreffii* hibrit genotipin 34, 37 ve 40 no'lu izolatlarının *cox 2* gen bölgeleri arasındaki genetik uzaklığın (p-distance) %1,04 – %4,82 arasında olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2).

Anisakis pegreffii türünün 30 ve 56 no'lu izolatlarının *cox 2* gen bölgeleri arasındaki genetik uzaklığın (p-distance) %2,47 olduğu saptanmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. *Anisakis* türlerinin *cox 2* gen bölgesinin genetik uzaklıkları (%)

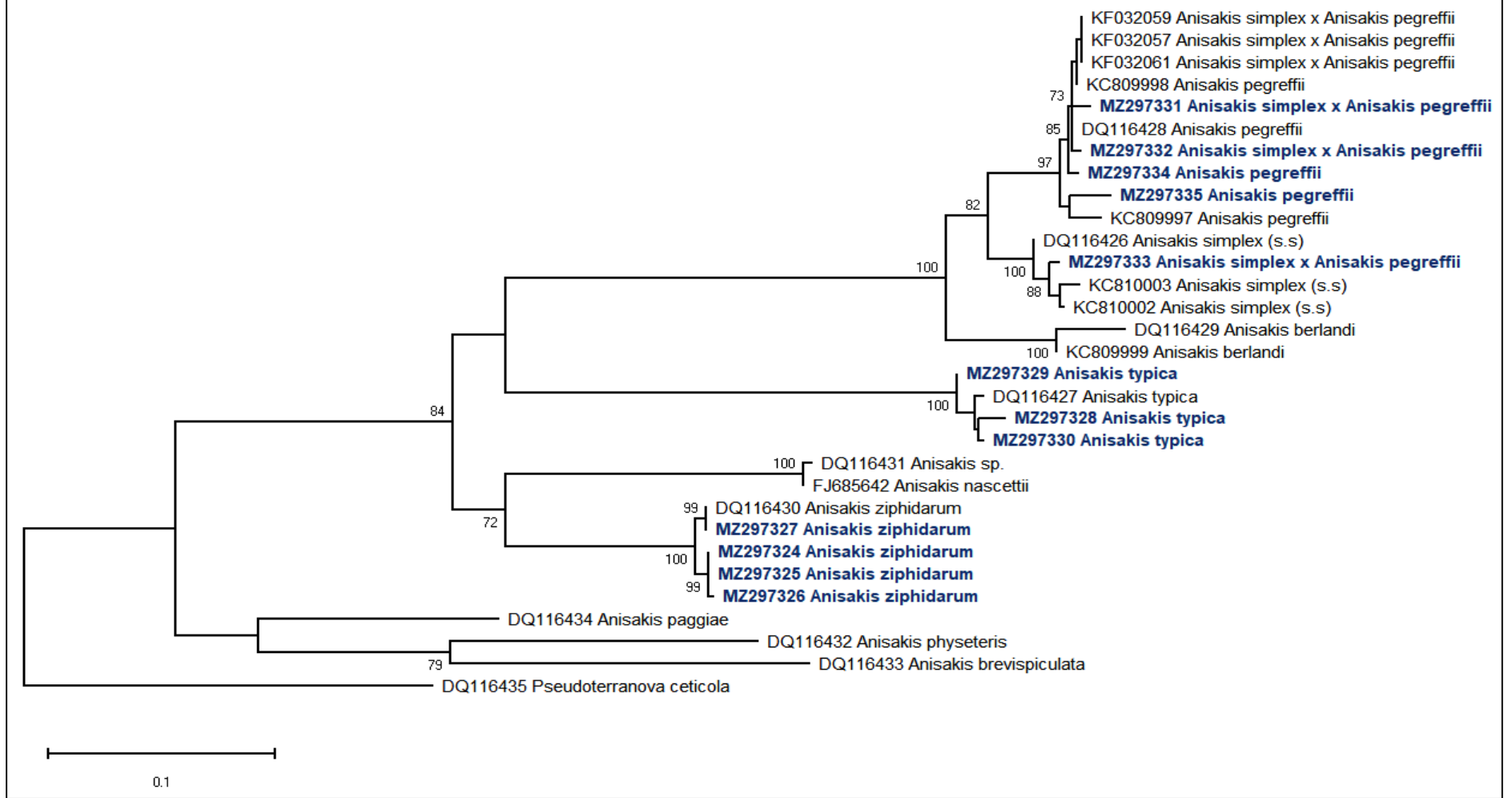
<i>Anisakis</i> türleri	İzolat No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 MZ297324 <i>A. ziphidarum</i>	28												
2 MZ297325 <i>A. ziphidarum</i>	39	0,00											
3 MZ297326 <i>A. ziphidarum</i>	45	0,17	0,17										
4 MZ297327 <i>A. ziphidarum</i>	47	0,87	0,87	1,04									
5 MZ297328 <i>A. typica</i>	16	14,60	14,60	14,83	15,05								
6 MZ297329 <i>A. typica</i>	17	13,73	13,73	13,95	14,16	1,92							
7 MZ297330 <i>A. typica</i>	27	14,60	14,60	14,83	15,05	1,21	1,04						
8 MZ297331 <i>A. simplex</i> (s.s.) x <i>A. pegreffii</i>	34	13,50	13,50	13,71	13,50	15,15	15,15	14,93					
9 MZ297332 <i>A. simplex</i> (s.s.) x <i>A. pegreffii</i>	37	12,64	12,64	12,85	12,64	14,50	14,50	14,28	1,04				
10 MZ297333 <i>A. simplex</i> (s.s.) x <i>A. pegreffii</i>	40	13,07	13,07	13,28	12,64	15,15	15,37	15,15	4,82	4,45			
11 MZ297334 <i>A. pegreffii</i>	30	12,85	12,85	13,07	13,28	14,71	14,71	14,50	1,22	0,87	5,01		
12 MZ297335 <i>A. pegreffii</i>	56	13,50	13,50	13,71	13,93	14,28	14,28	14,06	2,65	2,65	5,58	2,47	

Bu araştırmada Ege Denizi'nde yakalanan lipsoz balıklarından izole edilen *Anisakis* spp. larvaları ile daha önce GenBank veri tabanına kaydı yapılan erişkin *Anisakis* türlerinin referans sekansların *cox 2* gen bölgelerinin ML metodu kullanılarak oluşturulan filogenetik ağacı Şekil 4.13'te gösterilmiştir.

ML ağacında *A. ziphidarum* larvalarının (MZ297324–MZ297327) erişkin *A. ziphidarum* (DQ116430) türü ve *A. typica* larvalarının (MZ297328–MZ297330) erişkin *A. typica* (DQ116427) türü ile kümelendiği saptanmıştır (Şekil 4.13).

Filogenetik ağaçta bu araştırmada izole edilen *A. pegreffii* larvası (MZ297335) ile erişkin *A. pegreffii* (KC809997) türü kardeş taksonlardır. Ayrıca *A. pegreffii* larvası (MZ297334) ile *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* (MZ297331–MZ297332) larvalarının erişkin *A. pegreffii* (DQ116428, KC809998) türü ile kümelendiği görölmüştür (Şekil 4.13).

Yine bu çalışmada izole edilen *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* (MZ297333) larvasının erişkin *A. simplex* (s.s) (DQ116426, KC810002–KC810003) türü ile kümelendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *Anisakis* spp. türlerinin *cox 2* gen bölgesi ML analizlerine göre filogenetik ilişkileri. ML ağacı HKY+G+I modeli ile oluşturulmuştur. GenBank erişim numaraları takson isimlerinin önünde belirtilmiştir. Bu araştırmadaki izolatlar koyu mavi renk ile gösterilmiştir. Ağaç 100 tekrar ile oluşturulmuş ve dalların önündeki rakamlar destek değerlerini göstermektedir

5. TARTIŞMA

Bu araştırmada Türkiye'nin Ege kıyılarında avlanan ve ticari değeri oldukça yüksek olan lipsoz balıklarında ilk kez *Anisakis* tip I larvalar morfolojik olarak tanımlanmış ve bu larvaların RFLP ve DNA dizi analizleri sonucunda moleküler olarak *A. pegreffii*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip ve *A. ziphidarum* türleri olduğu anlaşılmıştır.

Anisakis cinsi içerisinde yer alan türlerin deniz balıklarını ve kafadanbacaklıları enfekte eden L3'leri morfolojik olarak birbirlerine çok benzemektedirler. *Anisakis* larvaları morfolojik özellikleri dikkate alınarak tip I ve II gibi farklı morfolojik türler altında sınıflandırılmaktadır. Örneğin *Anisakis simplex* kompleksi (*A. pegreffii*, *A. simplex* (s.s.), *A. berlandi*), *A. ziphidarum*, *A. nascettii* ve *A. typica* türleri morfolojik özellikleri dikkate alındığında tip I morfolojik (sensu Berland, 1961) içerisinde yer almaktadır ve türler morfolojik olarak birbirlerinden ayırt edilemez (Mattiucci and Nascetti, 2008; Mattiucci, et al., 2018). Bu yüzden deniz balıklarını enfekte eden *Anisakis* larvalarının sadece morfolojik tanımlanmalarının yapıldığı durumlarda parazitlerin tür bazında tanımlanması kullanışlı değildir. Buna rağmen önceki yıllarda ülkemiz karasularında avlanan deniz balıklarında yapılan parazitolojik incelemeler sonucunda morfolojik olarak tanımlanmış *Anisakis* larvaları *A. pegreffii* ve *A. simplex* tür isimleri ile bildirilmiştir (Akmirza, 1997; 2000; 2003; 2012; 2013; Oğuz, vd., 2000; Keser, vd., 2007; Özkan, vd., 2010; Tepe ve Oğuz, 2013; Şahin ve Sağlam, 2016). Bu tez araştırmasında morfolojik olarak tanımlanmış *Anisakis* larvalarının ön uçlarında tek larval dış olması, ventriküler yapının tek parça bütün şekli, boşaltım deliğinin ön uçta dudakların hemen alt kısmında dışarı açılması ve kuyruk ucunda tek diken benzeri (mukron) yapının olması nedeniyle üçüncü dönem *Anisakis* tip I larva morfolojisi olduğu tespit edilmiştir.

Tatlı su ve deniz balıklarını enfekte eden ascaridoid nematodlardan *Anisakis*, *Contracaecum* ve *Hysterothylacium* cinslerinde yer alan nematod türlerinin larva aşamalarının morfolojik olarak tür bazında doğru tanımlanması zordur. Günümüzde nükleer ribozomal ve mitokondriyal DNA'nın ITS ile *cox 2* gen bölgelerinin RFLP ve DNA dizi analizlerini içeren moleküler tekniklerin ascaridoid nematodların larva ve erişkin dönemlerinin tür düzeyinde doğru tanımlanmaları için etkili olduğu kanıtlanmıştır (Zhu, et al., 1998; D'Amelio, et al., 2000; Abollo, et al., 2003; Pontes,

et al., 2005; Valentini, et al., 2006; Pekmezci, 2014; 2019; Pekmezci, vd., 2013; 2014a, b; Roca-Geronès, et al., 2018; 2020; Şimşek, vd., 2018; 2021; Tedesco, et al., 2018; Pekmezci ve Yardımcı, 2019; Khammassi, et al., 2020). Bu araştırmada *Anisakis* larvalarının tür bazında doğru identifikasyonları için moleküler tekniklerden RFLP ve DNA dizi analiz yöntemleri kullanılmıştır.

Anisakis cinsinde yer alan parazitlerin tür düzeyinde tanımlanması için morfolojik incelemeler kullanışlı değildir. Ribosomal DNA'nın ITS gen bölgesinin spesifik kesim enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen RFLP yönteminin uygulanması *Anisakis* larvalarının doğru tanımlanmasına olanak sağlamaktadır (D'Amelio, et al., 2000; Abollo, et al., 2003; Pontes, et al., 2005). *Anisakis* türlerinin ITS bölgesi RFLP tekniği ile 16 enzim (*Alu* I, *Dra* I, *EcoR* I, *EcoRV*, *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I, *Hpa* II, *Hsp* 92II, *Mbo* I, *Nci* I, *Pst* I, *Pvu* II, *Rsa* I, *Sac* I, *Taq* I) ile kesilmiştir. Bu 16 enzimden 12'si bir veya daha fazla sayıda *Anisakis* türünün hedef ITS dizisini keserken, dört enzim (*Dra* I, *EcoRV*, *Pst* I, *Sac* I) ise hedef diziyi kesmemiştir (D'Amelio et al., 2000; Pontes, et al., 2005). *Anisakis simplex* (s.s.) x *Anisakis pegreffii* hibrit genotip *Hha* I enzimi ile kesildiğinde *A. pegreffii* ve *A. simplex* (s.s.) ile benzer bant profilini gösterirken, *Hinf* I ile kesildiğinde *A. pegreffii* ve *A. simplex* (s.s.) türlerinin kombine bant profillerini göstermektedir (Abollo, et al., 2003). Bu raporlar iki kesim enzimi *Hinf* I ve *Hha* I'nin *Anisakis* cinsinin farklı türlerini parça uzunlukları ve desenleriyle ayırt etme konusunda yeterli olduğunu göstermektedir. Bu araştırmada daha önce bildirilen *A. pegreffii*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip ve *A. ziphidarum* türlerinin *Hinf* I ve *Hha* I kesim profilleri ile benzer DNA bant profilleri saptanmıştır (D'Amelio, et al., 2000; Abollo, et al., 2003; Abe, et al., 2005; Martín-Sánchez, et al., 2005; Pontes, et al., 2005; Umehara, et al., 2006; Farjallah, et al., 2008a; b; Du, et al., 2010; Suzuki, et al., 2010; Cavallero, et al., 2012; Smrzlić, et al., 2012; Pekmezci, 2014; 2019; Pekmezci, vd., 2014a; Chen and Shih, 2015; Cammilleri, et al., 2018; Gaglio, et al., 2018; Roca-Geronès, et al., 2020; Simsek, et al., 2020).

Anisakis larvalarının tür düzeyinde doğru teşhisinde larvaların PZR ile çoğaltılan ITS ve *cox 2* gen bölgelerinin DNA dizi analizleri sıklıkla ve etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Valentini, et al., 2006; Pekmezci, 2014; 2019; Pekmezci, vd., 2014a; Chen and Shih, 2015; Cammilleri, et al., 2018; Gaglio, et al., 2018; Simsek, vd., 2020). Bu araştırmada lipsoz balıklarından RFLP yöntemi ile tür tayini

yapılan *A. ziphidarum*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip ve *A. pegreffii* türlerinin *cox 2* gen bölgelerinin DNA dizi analizleri sonucunda 582 baz uzunluğunda DNA dizileri elde edilmiştir. Ege Denizi'nde avlanan lipsozlardan (*Scorpaena scrofa* L.) izole edilen *A. ziphidarum* larvalarının (MZ297324–MZ297327) *cox 2* gen bölgelerinin BLAST analizleri sonrasında Atlas Okyanusu'nun Güney Afrika kıyılarındaki gagalı balinagillerden *Mesoplodon layardii* (Ziphiidae) ve *Ziphius cavirostris* (Ziphiidae) türlerinden izole edilen erişkin *A. ziphidarum* (DQ116430) türünün referans dizisi ile %98,97 – %100 oranında benzerlik tespit edilmiştir (Valentini, et al., 2006). Bu araştırmada izole edilen *A. typica* larvalarının (MZ297328–MZ297330) *cox 2* gen bölgelerinin BLAST analizleri sonrasında Atlas Okyanusu'nun Güney Afrika kıyılarından *Stalia fluviatilis* (Delphinidae) türü yunustan izole edilen erişkin *A. typica* (DQ116427) türünün referans dizisi ile %98,80 – %99,31 oranında benzerlik saptanmıştır (Valentini, et al., 2006). Lipsozlardan izole edilen *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotipin (MZ297331–MZ297333) *cox 2* gen bölgelerinin BLAST analizleri sonrasında Ege Denizi'nin Türkiye kıyılarında avlanan deniz balıklarından *Zeus faber*, *Micromesistius poutassou* ve *Scomber scombrus* türlerinden izole edilen üçüncü dönem *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* larvası (KF032057, KF032059, KF032061) ile %95,83 – %99,31 oranında benzerlik tespit edilmiştir (Pekmezci, vd., 2014a). Ayrıca lipsozlarda moleküler olarak teşhis edilen *A. pegreffii* larvalarının (MZ297334–MZ297335) *cox 2* gen bölgelerinin BLAST analizleri sonrasında Atlas Okyanusu'nun İspanya kıyılarından *Delphinus delphis* (Delphinidae) türü yunustan izole edilen erişkin *A. pegreffii* (DQ116428) türünün referans dizisi ile %97,77 – %99,48 oranında benzerlik tespit edilmiştir (Valentini, et al., 2006).

Ülkemiz karasularında avlanıp insan tüketimine sunulan deniz balıklarındaki *Anisakis* türlerinin moleküler identifikasyonları hakkında sınırlı sayıda araştırma yapılmıştır (Pekmezci, vd., 2014a). Pekmezci, vd., (2014a) tarafından Karadeniz, Ege ve Akdeniz kıyılarında avlanan ve yetiştiriciliği yapılan 31 farklı türde 1145 adet deniz balığı incelenmiş ve balıkların 56 (%4,8)'sında toplam 776 adet *Anisakis* tip I larva morfolojik olarak identifiye edilmiştir. Ege ve Akdeniz'de avlanan kolyoz (*Scomber japonicus*), uskumru (*Scomber scombrus*), bakalyaro (*Micromesistius poutassou*), berlam (*Merluccius merluccius*), dülger (*Zeus faber*), istavrit (*Trachurus mediterraneus*) ve barbunya (*Mullus barbatus*) olmak üzere 7 balık türünde

moleküler olarak ilk kez *A. pegreffii*, *A. typica* ve *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip teşhis edilmiştir (Pekmezci, vd., 2014a). Aynı araştırmada Karadeniz’de yetiştiriciliği yapılan ve avlanan 16 farklı balık türünde *Anisakis* larvaları ile karşılaşılmemiştir ve bu durumun Karadeniz’in suyunun fizikokimyasal yapısı ile ilgili olduğu ilişkilendirilmiştir (Pekmezci, vd., 2014a). Gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından Karadeniz’de avlanan ya da yetiştirilen deniz balıklarının *Anisakis* larvaları yönünden Ege ve Akdeniz’de avlanan ve yetiştirilen deniz balıklarına göre daha az risk taşıdığı tespit edilmiştir (Pekmezci, vd., 2014a). Bu tez araştırması ile ülkemiz Ege Denizi kıyılarında avlanan ve ticari değeri olan lipsoz (*Scorpaena scrofa*) balıklarında ilk kez *Anisakis* larvalarının enfeksiyon oranı, yoğunluğu ve bolluğu araştırılmış ve moleküler olarak ilk kez *A. pegreffii*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip ve *A. ziphidarum* türleri identifiye edilmiştir. Bu araştırma ile ülkemiz karasularında ilk kez *A. ziphidarum* türünün varlığı tespit edilmiştir. Lipsoz balıklarında *Anisakis* larvalarının enfeksiyon oranının %9,6 ve identifiye edilen larvaların %50’sinin zoonoz *A. pegreffii* türü olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle Ege Denizi’nde avlanıp insan tüketimine sunulan lipsozların zoonoz *A. pegreffii* larvaları yönünden gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından risk taşıdığı görülmektedir.

Günümüze kadar lipsoz balıklarında *Anisakis* larvalarının enfeksiyon oranları, yoğunluk ve bollukları ile *Anisakis* türlerinin moleküler identifikasyonlarını hakkında az sayıda araştırma yapılmıştır (Abollo, et al., 2001; Ferrantelli, et al., 2015; Costa, et al., 2018). Abollo, et al., (2001) tarafından İspanya’nın Atlantik Okyanusu kıyılarında avlanan 25 lipsoz balığı incelenmiş ve %100 enfeksiyon oranı ile 6,4 enfeksiyon yoğunluğu ve bolluğunda *Anisakis* larvaları saptanmıştır. Bu larvaların moleküler olarak *A. pegreffii* ve *A. simplex* (s.s.) türleri olduğu saptanmıştır (Abollo, et al., 2001). Batı Akdeniz’de (FAO 37.1.3) yakalanan 13 deniz balık türü arasında toplam 11 lipsozda %27 enfeksiyon oranında *Anisakis* spp. larvası tespit edilmiştir. Enfekte tüm deniz balıklarından toplanan larvaların %10’nun moleküler identifikasyonu yapılsa da lipsoz balıklarının hangi *Anisakis* türü ile enfekte olduğu açıkça belirtilmemiştir (Ferrantelli, et al., 2015). Akdeniz’den (FAO 37, FAO 37.2.2, FAO 37.3) avlanan 15 deniz balık türü arasında toplam 8 lipsozda (*S. scrofa*) %50 enfeksiyon oranında moleküler olarak *A. pegreffii* türü saptanmıştır (Costa, et al., 2018). Ayrıca Akdeniz’de yakalanan lipsozlarda morfolojik olarak

Anisakis sp. tip I (Berland, 1961) ve tip II (Berland, 1961) larval morfolojileri tespit edilmiştir (Petter and Maillard, 1988). Bu tez çalışması ile ilk kez Ege Denizi'nde avlanan lipsozlarda %9,6 enfeksiyon oranı ile 2,8 enfeksiyon yoğunluğu ve 0,2 enfeksiyon bolluğunda *Anisakis* spp. larvaları saptanmış ve moleküler olarak *A. pegreffii*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip ve *A. ziphidarum* türleri identifiye edilmiştir.

Anisakis ziphidarum türünün deniz balıklarındaki larval aşamasının varlığına ilişkin güncel veriler hala yetersizdir. Bu tür Doğu Akdeniz, İber Atlantik kıyısı, Moritanya kıyıları ve Fas Atlantik kıyısından *Merluccius merluccius*, Yeni Zelanda kıyılarından *Allocyttus niger*, Azor Adaları ve Fas Atlantik kıyısından *Scomber japonicus*, Fas Atlantik kıyısından *Scomber scombrus*, Filipin Sahilinden *Pagellus bogaraveo*, Fas Atlantik kıyısından *Hoplostethus cadenati*, Madeira Adasından *Aphanopus carbo*, Alboran Denizi'nden *Lepidopus caudatus* ve Orta Akdeniz'den *Xiphias gladius* ve *Diaphus metopoclampus* gibi deniz balığı türlerinde rapor edilmiştir (Gaglio, vd., 2018; Mattiucci, et al., 2018). *Anisakis typica* 35–40°Kuzey ile 36°Güney enlem koordinatları arasında yer alan daha sıcak ılıman ve tropikal sulara kadar dağılım göstermektedir ve bu alanlarda çok sayıda deniz balığı türlerinde üçüncü dönem larvaları rapor edilmiştir (Mattiucci, et al., 2018). Ayrıca hibrit genotip (hibrit form) Atlas Okyanusu, Fas ve Moritanya kıyıları, Tiren Denizi, Ege Denizi, Japonya'nın Pasifik kıyıları ile Çin'in Sarı Denizi gibi farklı su kaynaklarında avlanan çok sayıda deniz balığı türlerinde bildirilmiştir (Abollo, et al., 2003; Martín-Sánchez, et al., 2005; Umehara, et al., 2006; Farjallah, et al., 2008a, b; Du, et al., 2010; Abattouy, et al., 2013; Meloni, et al., 2011; Cavallero, et al., 2012; Chaligiannis, et al., 2012; Pekmezci, et al., 2014; Costa, et al., 2016; Molina-Fernández, et al., 2018). Bu tez çalışması ile lipsozlar *A. ziphidarum*, *A. typica* ve *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip için yeni bir ara/paratenik konak olarak tespit edilmiştir.

6. SONUÇ

Bu doktora tezi, Türkiye'nin Ege Denizi kıyılarında (FAO 37.3.1) avlanıp insan tüketimine sunulan ticari değeri yüksek olan lipsoz (*Scorpaena scrofa* L.) balıklarında ilk kez *Anisakis* larvalarının varlığının araştırılması, tespit edilen larvaların RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ve DNA dizi analizleri ile tür identifikasyonlarının yapılması ve *Anisakis* larvalarının enfeksiyon oranı, yoğunluğu ve bolluğunun ortaya konulması konularında ilk kapsamlı ve güncel verileri içermektedir. Parazitolojik incelemesi yapılan 272 adet lipsozun 26'sının *Anisakis* spp. larvaları ile enfekte olduğu ve enfeksiyon oranının %9,6 olduğu tespit edilmiştir. *Anisakis* spp. larvalarının enfeksiyon yoğunluğu 2,8 (1–21 larva) ve enfeksiyon bolluğu 0,2 olarak saptanmıştır. İncelenen lipsozlardan toplam 74 adet *Anisakis* spp. larvası karın boşluğu, iç organlarının yüzeyi ve mezenteriyumdan toplanmıştır. Lipsozların kas dokularında *Anisakis* spp. larvaları ile karşılaşılmamıştır. Ayrıca lipsozlarda Raphidascarididae ailesinden *Hysterothylacium* spp. larvaları ile karşılaşmıştır.

Lipsoz balıklarında ilk kez *Anisakis pegreffii*, *A. typica*, *A. simplex* (s.s) x *A. pegreffii* hibrit genotip ve *A. ziphidarum* türleri moleküler olarak tanımlanmıştır. Bu araştırma ile ülkemiz karasularında ilk kez *A. ziphidarum* rapor edilmiştir. Bununla birlikte lipsoz türünün *A. ziphidarum*, *A. typica* ve *A. simplex* (s.s.) x *A. pegreffii* hibrit genotip için yeni bir ara/paratenik konak olduğu tespit edilmiştir.

Lipsozlarda zoonoz karakterli *A. pegreffii* varlığı gıda güvenliği açısından tüketicilere risk oluşturabilir. Türk mutfağında çiğ ve az pişmiş balık yeme alışkanlığının yaygın olmadığı ve lipsozların kas dokularında *Anisakis* larvaları ile karşılaşmadığı için tüketiciler tarafından canlı larvaların ağız yolu ile alınma ihtimali düşüktür. Ama *A. pegreffii* ile enfekte lipsozların insanlar tarafından tüketilmesi sonucunda parazitik alerjiler şekillenebilir.

Bu araştırmanın sonuçları, yetkili kişilerin gıda güvenliği açısından *Anisakis* kaynaklı alerji riskini azaltmak için HACCP programını yeniden düzenlemelerinde önemli bir etkiye sahip olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abattouy, N., López, A.V., Maldonado, J.L., Benajiba, M.H., Martín-Sánchez, J. (2013). Epidemiology and molecular identification of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in the horse mackerel *Trachurus trachurus* from northern Morocco. *Journal of Helminthology*. 88(3). 257-263.
- Abe, N., Ohya, N., Yanagiguchi, R. (2005). Molecular characterization of *Anisakis pegreffii* larvae in Pacific cod in Japan. *Journal of Helminthology*. 79(4). 303-306.
- Abollo, E., Gestal, C., Pascual, S. (2001). *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: an updated perspective. *Parasitology Research*. 87(6). 492-499.
- Abollo, E., Paggi, L., Pascual, S., D'Amelio, S. (2003). Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* ss and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infection, Genetics and Evolution*. 3(3). 175-181.
- Adroher-Auroux, F.J., Benítez-Rodríguez, R. (2020). Anisakiasis and *Anisakis*: An underdiagnosed emerging disease and its main etiological agents. *Research in Veterinary Science*. 132. 535-545.
- Akmirza, A. (1997). Kolyoz (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1780) balığının parazit faunasından örnekler. *Su Ürünleri Dergisi*. 14(1-2). 173-181.
- Akmirza, A. (2000). Seasonal distribution of parasites detected in fish belonging to the Sparidae family found near Gökçeada. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 24(4). 435-441.
- Akmirza, A. (2012). Metazoan parasite fauna of conger eel (*Conger conger* L.) near Gökçeada, northeastern Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 18(5). 845-848.
- Akmirza, A. (2013). Gökçeada kıyı sularındaki balıkların parazitik nematodları. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 37(3). 199-202.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17). 3389-3402.
- Anderson, R.C. (2000). *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. CABI Publishing, Wallingford.
- Arizono, N., Yamada, M., Tegoshi, T., Yoshikawa, M. (2012). *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii*: biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. *Foodborne Pathogens and Disease*. 9(6). 517-521.
- Arslan, S. (2017). *İzmir Körfezi'nde Yaşayan Lipsoz (Scorpaena scrofa Linnaeus, 1758)'un Yaş ve Bazı Büyüme Özelliklerinin Belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi. Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Audicana, M.T., Ansotegui, I.J., de Corres, L.F., Kennedy, M.W. (2002). *Anisakis simplex*: dangerous—dead and alive ?. *Trends in Parasitology*. 18(1). 20-25.
- Audicana, M.T., Kennedy, M.W. (2008). *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*. 21(2). 360-379.
- Baird, F.J., Gasser, R.B., Jabbar, A., Lopata, A.L. (2014). Foodborne anisakiasis and allergy. *Molecular and Cellular Probes*. 28(4). 167-174.
- Bao, M., Garci, M.E., Antonio, J.M., Pascual, S. (2013). First report of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae) in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Food Control*. 33(1). 81-86.

- Bat, L., Erdem, Y., Ustaoglu Tırl, S., Yardım, Ö. (2008). *Balık Sistematiği*. Nobel Yayınevi. Ankara.
- Berland, B. (1961). Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*. 2(1). 1-50.
- Bilecenoğlu, M., Kaya, M., Cihangir, B., Çicek, E. (2014). Türkiye deniz balıklarının güncellenmiş listesi. *Turkish Journal of Zoology*. 38. 901-929.
- Bouree, P., Klimpel, S., Navone G.T. (1995). Anisakidosis: report of 25 cases and review of the literature. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 18(2). 75-84.
- Caballero, M.L., Moneo, I. (2004). Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitology Research*. 93(3). 248-251.
- Cabiddu, S., Pedoni, C., Pesci, P., Porcu, C. (2010). Trophic habits of red scorpionfish *Scorpaena scrofa* (Osteichthyes, Scorpaeniformes) in the Central Western Mediterranean. *Rapport de la Commission Internationale de la Mer Méditerranée*. 39. 464.
- Cammilleri, G., Costa, A., Graci, S., Buscemi, M.D., Collura, R., Vella, A., Pulvirenti, A., Cicero, A., Giangrosso, G., Schembri, P., Ferrantelli, V. (2018). Presence of *Anisakis pegreffii* in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) commercialized in Southern Italy: A first report. *Veterinary Parasitology*. 259. 13-16.
- Carballeda-Sangiao, N., Rodríguez-Mahillo, A.I., Careche, M., Navas, A., Caballero, T., Dominguez-Ortega, J., Palomo, J., González-Muñoz, M. (2016a). Anisakis-like protein is a pepsin-and heat-resistant major allergen of *Anisakis* spp. and a valuable tool for *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis. *International Archives of Allergy and Immunology*. 169(2). 108-112.
- Carballeda-Sangiao, N., Rodriguez-Mahillo, A.I., Careche, M., Navas, A., Moneo, I., González-Muñoz, M. (2016b). Changes over time in IgE sensitization to allergens of the fish parasite *Anisakis* spp. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 10(7). e0004864.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 17(4). 540-552.
- Cavallero, S., Ligas, A., Bruschi, F., D'Amelio, S. (2012). Molecular identification of *Anisakis* spp. from fishes collected in the Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). *Veterinary Parasitology*. 187(3-4). 563-566.
- Chai, J.Y., Murrell, K.D., Lymbery, A. J. (2005). Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *International Journal for Parasitology*. 35(11-12). 1233-1254.
- Chaligiannis, I., Lalle, M., Pozio, E., Sotiraki, S. (2012). Anisakidae infection in fish of the Aegean Sea. *Veterinary Parasitology*. 184(2-4). 362-366.
- Chen, H.Y., Shih, H.H. (2015). Occurrence and prevalence of fish-borne *Anisakis* larvae in the spotted mackerel *Scomber australasicus* from Taiwanese waters. *Acta Tropica*. 145. 61-67.
- Cipriani, P., Smaldone, G., Acerra, V., D'Angelo, L., Anastasio, A., Bellisario, B., Palma, G., Nascetti, G., Mattiucci, S. (2015). Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of *Anisakis pegreffii* and *Anisakis simplex* (ss) in European hake *Merluccius merluccius* from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 198(2). 1-8.
- Cipriani, P., Acerra, V., Bellisario, B., Sbaraglia, G.L., Cheleschi, R., Nascetti, G., Mattiucci, S. (2016). Larval migration of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy, *Engraulis encrasicolus*: Implications to seafood safety. *Food Control*. 59. 148-157.

- Cipriani, P., Sbaraglia, G.L., Palomba, M., Giulietti, L., Bellisario, B., Bušelić, I., Mladineo, I., Chelieschi, R., Nascetti, G., Mattiucci, S. (2018a). *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy *Engraulis encrasicolus* from the Mediterranean Sea: Fishing ground as a predictor of parasite distribution. *Fisheries Research*. 202. 59-68.
- Cipriani, P., Sbaraglia, G.L., Paoletti, M., Giulietti, L., Bellisario, B., Palomba, M., Bušelić, I., Mladineo, I., Nascetti, G., Mattiucci, S. (2018b). The Mediterranean European hake, *Merluccius merluccius*: detecting drivers influencing the *Anisakis* spp. larvae distribution. *Fisheries Research*. 202. 79-89.
- Choudhury, A., Cole, R.A. (2008). "Phylum nematoda". Eiras, J.C., Segner, H., Wahli, T., Kapoor, B.G. (eds.) in: *Fish Diseases* (s.1077-1128). Enfield, USA. CRC Press.
- Costa, A., Cammilleri, G., Graci, S., Buscemi, M.D., Vazzana, M., Principato, D., Giangrosso, G., Ferrantelli, V. (2016). Survey on the presence of *A. simplex* ss and *A. pegreffii* hybrid forms in Central-Western Mediterranean Sea. *Parasitology International*. 65(6). 696-701.
- Costa, A., Cammilleri, G., Graci, S., Collura, R., Drussilla, M., Ferrantelli, V. (2018). Detection of Anisakidae larvae (Nematoda) in fish products commercialized in Sicily. *Medicine Papers*. 4(1). 7-14.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., 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(4). 591-593.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanço, 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. *International Journal for Parasitology*. 30(2). 223-226.
- Daschner, A., Alonso-Gómez, A., Cabañas, R., Suarez-de-Parga, J.M., López-Serrano, M.C. (2000). Gastroallergic anisakiasis: borderline between food allergy and parasitic disease-clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 105(1). 176-181.
- Daschner, A., Cuéllar, C., Rodero, M. (2012). The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help ?. *Trends in Parasitology*. 28(1). 9-15.
- Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., Gabriël, S. (2009). Emerging food-borne parasites. *Veterinary Parasitology*. 163(3). 196-206.
- Du, C., Zhang, L., Shi, M., Ming, Z., Hu, M., Gasser, R.B. (2010). Elucidating the identity of *Anisakis* larvae from a broad range of marine fishes from the Yellow Sea, China, using a combined electrophoretic-sequencing approach. *Electrophoresis*. 31(4). 654-658.
- EFSA (2010). Scientific opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*. 8(4). 1543.
- Ewing, B., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*. 8(3). 186-194.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*. 8(3). 175-185.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). (2014). *Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites*. Microbiological Risk Assessment Series (MRA) 23, Rome, Italy. Retrieved

June 08, 2021, from <http://www.fao.org/publications/card/en/c/ee07c6ae-b86c-4d5f-915c-94c93ded7d9e/>

- Fagerholm, H.P. (1982). *Parasites of fish in Finland. VI.Nematodes*. Abo Akademia. ABO, Finland.
- Farjallah, S., Busi, M., Mahjoub, M.O., Slimane, B.B., Paggi, L., Said, K., D'Amelio, S. (2008a). Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. *Parasitology International*. 57(4). 430-436.
- Farjallah, S., Slimane, B.B., Busi, M., Paggi, L., Amor, N., Blel, H., Said, K. D'Amelio, S. (2008b). Occurrence and molecular identification of *Anisakis* spp. from the North African coasts of Mediterranean Sea. *Parasitology Research*. 102(3). 371-379.
- Ferrantelli, V., Costa, A., Graci, S., Buscemi, M.D., Giangrosso, G., Porcarello, C., Palumbo, S., Cammilleri, G. (2015). Anisakid nematodes as possible markers to trace fish products. *Italian Journal of Food Safety*. 4(1). 4090.
- Froese, R., Pauly, D. (2017). Fishbase. *World Wide Web Electronic Publication*. Retrieved June 08, 2021, from www.fishbase.org.
- Fumarola, L., Monno, R., Ierardi, E., Rizzo, G., Giannelli, G., Lalle, M., Pozio, E. (2009). *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(9). 1157-1159.
- Gaglio, G., Battaglia, P., Costa, A., Cavallaro, M., Cammilleri, G., Graci, S., Buscemi, M.D., Ferrantelli, V., Andaloro, F., Marino, F. (2018). *Anisakis* spp. larvae in three mesopelagic and bathypelagic fish species of the central Mediterranean Sea. *Parasitology International*. 67(1). 23-28.
- Gómez-Mateos, M., Valero, A., Morales-Yuste, M., Martín-Sánchez, J. (2016). Molecular epidemiology and risk factors for *Anisakis simplex* s.l infection in blue whiting (*Micromesistius poutassou*) in a confluence zone of the Atlantic and Mediterranean: Differences between *A. simplex* s.s and *A. pegreffii*. *International Journal of Food Microbiology*. 232. 111-116.
- Guardone, L., Armani, A., Nucera, D., Costanzo, F., Mattiucci, S., Bruschi, F. (2018). Human anisakiasis in Italy: a retrospective epidemiological study over two decades. *Parasite*. 25. 41.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41. 95-98.
- Hillis, D.M., Bull, J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 42.182-192.
- Hochberg, N.S., Hamer, D.H., Hughes, J.M., Wilson, M.E. (2010). Anisakidosis: perils of the deep. *Clinical Infectious Diseases*. 51(7). 806-812.
- Izyumova, N.A. (1964). The formation of the parasitofauna of fishes in the Ribinsk reservoir. In *Parasitic worms and aquatic conditions. Proceedings of symposium, Prague*. (pp. 49-55). Czechoslovak Academy of Sciences.
- Jones, R.E., Deardorff, T.L. (1990). *Anisakis simplex*: histopathological changes in experimentally infected CBA/J mice. *Experimental Parasitology*. 70(3). 305-313.
- Karl, H., Baumann, F., Ostermeyer, U., Kuhn, T., Klimpel, S. (2011). *Anisakis simplex* (ss) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Diseases of Aquatic Organisms*. 94(3). 201-209.
- Karl, H., Levsen, A. (2011). Occurrence and distribution of anisakid nematodes in grey gurnard (*Eutrigla gurnardus* L.) from the North Sea. *Food Control*. 22(10). 1634-1638.

- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 28(12). 1647-1649.
- Keser, R., Bray, R.A., Oguz, M.C., Çelen, S., Erdoğan, S., Doğuturk, S., Aklanoğlu, G., Marti, B. (2007). Helminth parasites of digestive tract of some teleost fish caught in the Dardanelles at Çanakkale, Turkey. *Helminthologia*. 44(4). 217-221.
- Khammassi, M., Bahri, S., Pekmezci, G.Z. (2020). Morphological and molecular identification of *Hysterothylacium* larvae (Nematoda: Raphidascarididae) in marine fish from Tunisian Mediterranean coasts. *Parasitology Research*. 119(10). 3285-3296.
- Klimpel, S., Palm, H.W., Rückert, S., Piatkowski, U. (2004). The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). *Parasitology Research*. 94(1). 1-9.
- Klimpel, S., Busch, M.W., Kuhn, T., Rohde, A., Palm, H.W. (2010). The *Anisakis simplex* complex off the South Shetland Islands (Antarctica): endemic populations versus introduction through migratory hosts. *Marine Ecology Progress Series*. 403. 1-11.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35(6). 1547.
- Levsen, A., Lunestad, B.T. (2010). *Anisakis simplex* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. *Veterinary Parasitology*. 171(3-4). 247-253.
- Levsen, A., Karl, H. (2014). *Anisakis simplex* (sl) in Grey gurnard (*Eutrigla gurnardus*) from the North Sea: Food safety considerations in relation to fishing ground and distribution in the flesh. *Food Control*. 36(1). 15-19.
- Levsen, A., Svanevik, C.S., Cipriani, P., Mattiucci, S., Gay, M., Hastie, L.C., Bušelić, I., Mladineog, I., Karlh, H., Ostermeyerh, U., Buchmanni, K., Højgaardk, D.P., Gonzálezm, Á.F., Pascualm, S., Pierce, G.J. (2018). A survey of zoonotic nematodes of commercial key fish species from major European fishing grounds-Introducing the FP7 PARASITE exposure assessment study. *Fisheries Research*. 202. 4-21.
- Llarena-Reino, M., Piñeiro, C., Antonio, J., Outeriño, L., Vello, C., González, Á.F., Pascual, S. (2013). Optimization of the pepsin digestion method for anisakids inspection in the fishing industry. *Veterinary Parasitology*. 191(3-4). 276-283.
- Lunestad, B.T. (2003). Absence of nematodes in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in Norway. *Journal of Food Protection*. 66(1). 122-124.
- Lysne, D.A., Hemmingsen, W., Skorping, A. (1995). Pepsin digestion reveals both previous and present infections of metacercariae in the skin of fish. *Fisheries Research*, 24(2). 173-177.
- Kagei, N., Isogaki, H. (1992). A case of abdominal syndrome caused by the presence of a large number of *Anisakis* larvae. *International Journal for Parasitology*. 22(2). 251-253.
- Køie, M., Berland, B., Burt, M.D. (1995). Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudotetranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52(S1). 134-139.
- Lim, H., Jung, B. K., Cho, J., Yooyen, T., Shin, E.H., Chai, J.Y. (2015). Molecular diagnosis of cause of anisakiasis in humans, South Korea. *Emerging Infectious Diseases*. 21(2). 342-344.

- Martín-Sánchez, J., Artacho-Reinoso, M.E., Díaz-Gavilán, M., Valero-López, A. (2005). Structure of *Anisakis simplex* s.l. populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex* s.s.: Absence of reproductive isolation between both species. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 141(2). 155-162.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Clanchi, R., Paggi, L., Arduino, P., Margolis, L.L., Brattey, J., Webb, S., 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). *The Journal of Parasitology*. 83(3). 401-416.
- 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(1). 9-14.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Santos, C.P., Costa, G., Di Benedetto, A.P., Ramos, R., Argyrou, M., Cianchi, R., Bullini, L. (2002). Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*. 51(3). 159-170.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S.C., Barros, N.B., Cianchi, R., Bullini, L. (2005). Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*. 61(3). 157-171.
- Mattiucci, S., Nascetti, G. (2006). Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. *Parasite*. 13(2). 99-113.
- Mattiucci, S., Abaunza, P., Damiano, S., Garcia, A., Santos, M.N., Nascetti, G. (2007). Distribution of *Anisakis* larvae, identified by genetic markers, and their use for stock characterization of demersal and pelagic fish from European waters: an update. *Journal of Helminthology*. 81(2). 117-127.
- Mattiucci, S., Nascetti, G. (2008). Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*. 66. 47-148
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Borrini, F., Palumbo, M., Palmieri, R.M., Gomes, V., Casati, A., Nascetti, G. (2011). First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. *BMC Infectious Diseases*. 11. 82.
- Mattiucci, S., Fazii, P., De Rosa, A., Paoletti, M., Megna, A.S., Glielmo, A., De Angelis, M., Costa, A., Meucci, C., Calvaruso, V., Sorrentini, I., Palma, G., Bruschi, F., Nascetti, G. (2013). Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3). 496-499.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S.C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., Gibson, D.I., Nascetti, G. (2014). Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *The Journal of Parasitology*. 100(2). 199-214.
- Mattiucci, S., Paoletti, M., Colantoni, A., Carbone, A., Gaeta, R., Proietti, A., Frattaroli, S., Fazii, P., Bruschi, F., Nascetti, G. (2017). Invasive anisakiasis by the parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): diagnosis by real-time PCR hydrolysis probe system and immunoblotting assay. *BMC Infectious Diseases*. 17(1). 530.

- Mattiucci, S., Cipriani, P., Levsen, A., Paoletti, M., Nascetti, G. (2018). Molecular epidemiology of *Anisakis* and anisakiasis: an ecological and evolutionary road map. *Advances in Parasitology*. 99. 93-263.
- Maricchiolo, G., Casella, G., Mancuso, M., Genovese, L. (2014). Report of spontaneous spawning of captive red scorpionfish, *Scorpaena scrofa* (Linnaeus, 1758) with special attention on capture and broodstock management. *Aquaculture Research*. 47(2). 677-680.
- Mazzucco, W., Raia, D.D., Marotta, C., Costa, A., Ferrantelli, V., Vitale, F., Casuccio, A. (2018). *Anisakis* sensitization in different population groups and public health impact: A systematic review. *PloS One*. 13(9). e0203671.
- Meloni, M., Angelucci, G., Merella, P., Siddi, R., Deiana, C., Orrù, G., Salati, F. (2011). Molecular characterization of *Anisakis* larvae from fish caught off Sardinia. *Journal of Parasitology*. 97(5). 908-914.
- Mladineo, I., Popović, M., Drmić-Hofman, I., Poljak, V. (2015). A case report of *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. *BMC Infectious Diseases*. 16. 42.
- Mladineo, I., Bušelić, I., Hrabar, J., Vrbatović, A., Radonić, I. (2017). Population parameters and mito-nuclear mosaicism of *Anisakis* spp. in the Adriatic Sea. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 212. 46-54.
- Molina-Fernández, D., Malagón, D., Gómez-Mateos, M., Benítez, R., Martín-Sánchez, J., Adroher, F.J. (2015). Fishing area and fish size as risk factors of *Anisakis* infection in sardines (*Sardina pilchardus*) from Iberian waters, southwestern Europe. *International Journal of Food Microbiology*. 203. 27-34.
- Molina-Fernández, D., Rubio-Calvo, D., Adroher, F.J., Benítez, R. (2018). Molecular epidemiology of *Anisakis* spp. in blue whiting *Micromesistius poutassou* in eastern waters of Spain, western Mediterranean Sea. *International Journal of Food Microbiology*. 282. 49-56.
- Molnár, K., Buchmann, K., Székely, C. (2006). "Phylum Nematoda". Woo, P.T.K. (eds.). in: *Fish Diseases and Disorders, Protozoan and Metazoan Infections*. Second edition (s.417-444). Wallingford, UK. CAB International.
- Moneo, I., Caballero, M.L., Gómez, F., Ortega, E., Alonso, M.J. (2000). Isolation and characterization of a major allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 106(1). 177-182.
- Moneo, I., Caballero, M.L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A.I., Rodríguez-Perez, R., Silva, A. (2005). Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitology Research*. 96(5). 285-289.
- Moravec, F. (1994). *Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe*. Dordrecht Netherlands. Kluwer Academic Publishers.
- Moreno-Ancillo, A., Caballero, M.T., Cabanas, R., Contreras, J., Martín-Barroso, J.A., Barranco, P., López-Serrano, M. C. (1997). Allergic reactions to *Anisakis simplex* parasitizing seafood. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 79(3). 246-250.
- Myers, B.J. (1975). The nematodes that cause anisakiasis. *Journal of Milk and Food Technology*. 38(12). 774-782.
- Nadler, S.A., Hudspeth, D.S. (2000). Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *Journal of Parasitology*. 86(2). 380-393.

- Nunoo, F., Poss, S., Bannermann, P., Russell, B. (2015). *Scorpaena scrofa*. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T198748A15592127. Retrieved June 08, 2021, from <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T198748A15592127.en>
- Oğuz, M.C., Güre, H., Özdemir, H., Öztürk, M.O., Savaş, Y. (2000). A study of *Anisakis simplex* (Rudolphi 1809) in some economically important teleost fish caught on the Çanakkale coast and throughout the Dardanelles Strait. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*. 24(4). 431-434.
- Özkan, Y., Aksakal, E., Oğuz, M.C. (2010). İstavrit (*Trachurus trachurus*, l. 1758) balığında kaydedilen nematod larvalarının balık boy gruplarına göre karşılaştırmalı yaygınlık, ortalama yoğunluk ve bolluk parametrelerinin belirlenmesi. *Research Journal of Biology Sciences*. 3(1). 145-147.
- Quiazon, K.M.A., Zenke, K., Yoshinaga, T. (2013). Molecular characterization and comparison of four *Anisakis* allergens between *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* from Japan. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 190(1). 23-26.
- 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(3). 161-174.
- Palma, R., Mattiucci, S., Panetta, C., Raniolo, M., Magliocca, F.M., Pontone, S. (2018). Paucisymptomatic gastric anisakiasis: endoscopic removal of *Anisakis* sp. larva. *Mini-Invasive Surgery*. 2.1.
- Pascual, S., Abollo, E. (2005). Whaleworms as a tag to map zones of heavy-metal pollution. *Trends in Parasitology*. 21(5). 204-206.
- Pekmezci, G.Z., Bolukbas, C.S., Gurler, A.T., Onuk, E.E. (2013). Occurrence and molecular characterization of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) from *Merlangius merlangus euxinus* and *Trachurus trachurus* off the Turkish coast of Black Sea. *Parasitology Research*. 112(3). 1031-1037.
- Pekmezci, G.Z. (2014). Occurrence of *Anisakis simplex sensu stricto* in imported Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) represents a risk for Turkish consumers. *International Journal of Food Microbiology*. 185. 64-68.
- Pekmezci, G.Z., Onuk, E.E., Bolukbas, C.S., Yardimci, B., Gurler, A.T., Acici, M., Umur, S. (2014a). Molecular identification of *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) from marine fishes collected in Turkish waters. *Veterinary Parasitology*. 201(1-2). 82-94.
- Pekmezci, G.Z., Yardimci, B., Onuk, E.E., Umur, S. (2014b). Molecular characterization of *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) from *Zeus faber* (Pisces: Zeidae) caught off the Mediterranean coasts of Turkey based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitology International*. 63(1). 127-131.
- Pekmezci, G.Z. (2019). Occurrence of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) larvae in imported John Dory (*Zeus faber*) from Senegalese coast sold in Turkish supermarkets. *Acta Parasitologica*. 64(3). 582-586.
- Pekmezci, G.Z., Yardimci, B. (2019). On the occurrence and molecular identification of *Contracaecum* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Mugil cephalus* from Turkish waters. *Parasitology Research*. 118(5). 1393-1402.
- Petter, A.J., Maillard, C. (1988). Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. *Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle*. 10(2). 347-369.

- Pontes, T., D'Amelio, S., Costa, G., Paggi, L. (2005). Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. *Journal of Parasitology*. 91(6). 1430-1434.
- Rahmati, A.R., Kiani, B., Afshari, A., Moghaddas, E., Williams, M., Shamsi, S. (2020). World-wide prevalence of *Anisakis* larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: a systematic review. *Parasitology Research*. 119. 3585-3594.
- Roca-Geronès, X., Segovia, M., Godínez-González, C., Fisa, R., Montoliu, I. (2020). *Anisakis* and *Hysterothylacium* species in Mediterranean and North-East Atlantic fishes commonly consumed in Spain: Epidemiological, molecular and morphometric discriminant analysis. *International Journal of Food Microbiology*. 325. 108642.
- Roepstorff, A., Karl, H., Bloemsma, B., Huss, H.H. (1993). Catch handling and the possible migration of *Anisakis* larvae in herring, *Clupea harengus*. *Journal of Food Protection*. 56(9). 783-787.
- Rózsa, L., Reiczigel, J., Majoros, G. (2000). Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology*. 86(2). 228-232.
- Sakanari, J.A., Mckerrow, J.H. (1989). Anisakiasis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2(3). 278-284.
- Sánchez-Alonso, I., Carballeda-Sangiao, N., Gonzalez-Munoz, M., Navas, A., Arcos, S.C., Mendizábal, A., Tejada, M., Careche, M. (2018). Pathogenic potential of *Anisakis* L3 after freezing in domestic freezers. *Food Control*. 84. 61-69.
- Schoch, C.L., Ciuffo, S., Domrachev, M., Hotton, C.L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J.P., Sun, L., Turner, S., Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*. baaa062.
- Shamsi, S., Suthar, J. (2016). A revised method of examining fish for infection with zoonotic nematode larvae. *International Journal of Food Microbiology*. 227. 13-16.
- Simsek, E., Pekmezci, G.Z., Yildirim, A., Duzlu, O., Onder, Z., Ciloglu, A., Sursal, N., Yilmaz, E., Gonulalan, Z., Inci, A. (2020). Investigation of *Anisakis* larvae in different products of ready-to-eat fish meat and imported frozen fish in Turkey. *International Journal of Food Microbiology*. 333. 108829.
- Smrzlić, I.V., Valić, D., Kapetanović, D., Kurtović, B., Teskeredžić, E. (2012). Molecular characterisation of Anisakidae larvae from fish in Adriatic Sea. *Parasitology Research*. 111(6). 2385-2391.
- Suzuki, J., Murata, R., Hosaka, M., Araki, J. (2010). Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *International Journal of Food Microbiology*. 137(1). 88-93.
- Şahin, A., Sağlam, N. (2016). Çanakkale Yöresinden Avlanan Kolyoz (*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782), İstavrit (*Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758) ve Sardalya (*Sardinella aurita* Valenciennes, 1847)'da Nematodların Araştırılması. *Aquaculture Studies*. 16(1). 47-55.
- Şimşek, E., Yılmaz, E. (2016): Anisakiasis ve Halk Sağlığı. *Türkiye Klinikleri Food Sciences - Special Topics*. 202(3). 38-44.
- Şimşek, E., Çiloğlu, A, Yıldırım, A., Pekmezci, G.Z. (2018). Identification and molecular characterization of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae in bogue (*Boops boops* L.) from the Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 24. 525-530.
- Şimşek, E., Sürsal, N., Karademir, G.K., Pekmezci, G.Z. (2021). First molecular characterization of *Hysterothylacium fabri* larvae (Nematoda: Raphidascarididae) in

- the Mediterranean Sea based on the small subunit ribosomal RNA gene sequence. *Kocatepe Veterinary Journal*. 14(1). 71-76.
- Šantić, M., Pallaoro, A., Stagličić, N., Markov-Podvinski, M. (2011). Feeding habits of red scorpionfish, *Scorpaena scrofa* (Osteichthyes: Scorpaenidae) from the eastern central Adriatic Sea. *Cahiers de Biologie Marine*. 52(2). 217-226.
- Takabe, K., Ohki, S., Kunihiro, O., Sakashita, T., Endo, I., Ichikawa, Y., Sekido, H., Amano, T., Nakatani, Y., Suzuki, K., Shimada, H. (1998). Anisakidosis: a cause of intestinal obstruction from eating sushi. *The American Journal of Gastroenterology*. 93(7). 1172-1173.
- Tedesco, P., Gustinelli, A., Caffara, M., Patarnello, P., Terlizzi, A., Fioravanti, M.L. (2018). *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Raphidascarididae) in *Mullus surmuletus* (Perciformes: Mullidae) and *Uranoscopus scaber* (Perciformes: Uranoscopidae) from the Mediterranean. *Journal of Parasitology*. 104(3). 262-274.
- Tejada, M., Karl, H., de las Heras, C., Vidacek, S., Solas, M.T., Garcia, M.L. (2014). Does the intensity of *Anisakis* infection affect the quality of hake muscle ?. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 23(3). 221-236.
- Tepe, Y., Oğuz M. (2013). Nematode and acanthocephalan parasites of marine fish of the eastern Black Sea coasts of Turkey. *Turkish Journal of Zoology*. 37. 753-760.
- Thien, P.C., Dalsgaard, A., Thanh, B.N., Olsen, A., Murrell, K.D. (2007). Prevalence of fishborne zoonotic parasites in important cultured fish species in the Mekong Delta, Vietnam. *Parasitology Research*. 101(5). 1277-1284.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22). 4673-4680.
- Thu, N.D., Dalsgaard, A., Loan, L.T.T., Murrell, K.D. (2007). Survey for zoonotic liver and intestinal trematode metacercariae in cultured and wild fish in An Giang Province, Vietnam. *The Korean Journal of Parasitology*. 45(1). 45-54.
- Turan, C. (2007). *Türkiye kemikli deniz balıkları Atlası ve Sistematiği*. Adana. Nobel Kitabevi.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Matsui, T., Araki, J., Uchida, A. (2006). Molecular identification of *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. *Parasitology International*. 55(4). 267-271.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A. (2008). Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitology International*. 57(1). 49-53.
- Umur, Ş., Köroğlu, E., Güçlü, F., Tınar, R. (2006). "Nematoda". Tınar R. (ed.). in: *Helmintoloji*. Birinci Baskı. (s. 213-461). Ankara. Nobel Akademik Yayıncılık.
- Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S.C., Mignucci-Giannone, A.A., Colom-Llavina, M.M., Nascetti, G. (2006). Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox 2* sequences, and comparison with allozyme data. *Journal of Parasitology*. 92(1). 156-166.
- Vidaček, S., de las Heras, C., Solas, M.T., Mendizabal, A., Rodriguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M., Tejada, M. (2009). *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 89(12). 1997-2002.

- Vidaček, S., de las Heras, C., Solas, M.T., Mendizabal, A., Rodriguez-Mahillo, A.I., Tejada, M. (2010). Antigenicity and viability of *Anisakis* larvae infesting hake heated at different time-temperature conditions. *Journal of Food Protection*. 73(1). 62-68.
- Williams, H., Jones, A. (1994). *Parasitic Worms of Fish*. Taylor & Francis Ltd., London.
- Yera, H., Fréal, E., Dupouy-Camet, J. (2016). Molecular confirmation of *Anisakis pegreffii* as a causative agent of anisakidosis in France. *Digestive and Liver Disease*. 48(8). 970.
- Zhu, X., Gasser, R.B., Podolska, M., Chilton, N.B. (1998). Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology*. 28(12). 1911-1921.



ÖZ GEÇMİŞ

Ankara Keçiören Lisesi'ni bitirdikten sonra Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2004 yılında mezun oldu. 2006 yılında Tarım ve Orman Bakanlığı'nda Veteriner Hekim olarak göreve başladı. 2 yıl Kocaeli-Kandıra İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü ile 5 yıl Ankara-Çubuk İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü'nde çalıştıktan sonra 2013 yılından itibaren şu anki görev yeri olan Samsun Veteriner Kontrol Enstitü Müdürlüğü'nde çalışmaktadır. 2018 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans programını tamamladı. Orta düzeyde İngilizce bilmektedir. Evli ve 2 çocuğu bulunmaktadır. Temel ilgi alanları satrançtır (14/06/2021).

ORCID ID : <https://orcid.org/0000-0001-6244-414X>

Yayınlanmış Çalışmalar

1. Aydın, C., Pekmezci, G.Z. (2017). Tatlı su balıklarının *Ichthyophthirius multifiliis* enfeksiyonunda aşı çalışmaları. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 28(1), 23–27.

Projeler

1. Türkiye sularında yakalanan ve yetiştiriciliği yapılan levreklerde (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) diplectanid türlerin (Monogenea, Diplectanidae) moleküler karakterizasyonu. Araştırmacı, OMU PYO.VET.1904.17.007.
2. Türkiye'nin Ege kıyılarında avlanan lipsoz (*Scorpaena scrofa* Linnaeus, 1758) balığını enfekte eden *Anisakis* türlerinin (Nematoda: Anisakidae) moleküler teşhisi. Araştırmacı, OMU PYO.VET.1904.19.005.
3. Türkiye'de vektör kaynaklı önemli viral hayvan hastalıklarının (Mavi Dil, Epizootik Hemorajik Ateş, Üç Gün Hastalığı ve Akabane) teşhisi, vektörlerin tespiti ve erken uyarı sisteminin oluşturulması, Araştırmacı, TAGEM Projesi.
4. *Toxocara vitulorum*'un manda yetiştiriciliğinde varlığının araştırılması ve moleküler karakterizasyonu, Proje Lideri, TAGEM Projesi.