

文章编号: 1674-5566(2020)04-0585-08

DOI:10.12024/jsou.20190502637

东海区黄鳍东方鲀寄生异尖线虫的鉴定及河鲀毒素检测

毛 婕^{1,2}, 龚小玲^{1,2}, 鲍宝龙^{1,2}

(1. 上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘 要: 通过检查东海区 283 尾野生黄鳍东方鲀 (*Takifugu xanthopterus*) 样本, 发现具有河鲀毒素的黄鳍东方鲀也受到线虫的感染。11 月份黄鳍东方鲀体内异尖线虫感染情况最严重。通过形态学特征和线粒体 DNA 鉴定, 黄鳍东方鲀组织内寄生的线虫为派氏异尖线虫 (*Anisakis pegreffii*)。免疫组学分析发现异尖线虫体内含有河鲀毒素, 进一步的高效液相色谱-质谱检测结果显示异尖线虫体内河鲀毒素含量为 425 ng/g, 这是首次发现寄生在东方鲀体内的线虫具有河鲀毒素。

关键词: 东海; 黄鳍东方鲀; 派氏异尖线虫; 寄生; 河鲀毒素

中图分类号: S 931.1 **文献标志码:** A

派氏异尖线虫 (*Anisakis pegreffii*) 感染鱼类的情况较为严重, 各海域多种鱼类体内均有发现。在意大利市场上鲱鱼 (*Clupea pallasii*)、印度阿拉伯海区灯笼鱼 (*Myctophids*) 和日本海域捕获的鲈鱼 (*Scomber japonicus*) 体内均出现异尖线虫高度感染现象^[1-3]。我国东海、黄海和渤海鱼类寄生的异尖线虫分子鉴定主要是派氏异尖线虫, 占总数的 98% 以上, 为该海域的优势种^[4]; 南海鱼类寄生的异尖线虫与其他海域明显不同, 其优势种为典型异尖线虫 (*A. typica*)。多种海洋经济鱼类也发现受到不同程度的异尖线虫感染, 如带鱼 (*Trichiurus lepturus*) 体内线虫感染率为 71%、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 线虫感染率为 94%、蓝圆鲹 (*Decapterus maruadsi*) 线虫感染率为 100%^[5-6]。国内外报道异尖线虫寄生的鱼类宿主已有 249 种^[7]。

东方鲀是近海常见的鱼类, 其体内积累可致命的河鲀毒素 (Tetrodotoxin, TTX), 食用河鲀导致河鲀毒素中毒死亡事件时有发生^[8,9]。海区有毒的东方鲀是否也会受异尖线虫的感染呢? 在鲀毒动物红色斑点蝶鲰 (*Notophthalmus viridescens*) 肠

道内也发现线虫、吸虫和绦虫等寄生, 免疫组织化学染色发现, 线虫、吸虫和绦虫等寄生虫含河鲀毒素^[10], 但其未鉴定寄生虫具体种属。在日本海域的星点东方鲀 (*Takifugu niphobles*) 鳃部寄生桡足类山口绦刺鱼蚤 (*Taeniocanthus sp*) 和河鲀拟鱼虱 (*Pseudocaligus fugu*), 寄生虫中 TTX 量分别为 59 $\mu\text{g/g}$ 和 74 $\mu\text{g/g}$ ^[11]。为了了解野生东方鲀是否能寄生线虫情况, 以及寄生的线虫是否累积河鲀毒素, 调查了东海区常见东方鲀鱼类黄鳍东方鲀 (*Takifugu xanthopterus*) 的线虫寄生情况以及线虫累积河鲀毒素的情况。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

野生黄鳍东方鲀采自泥城水产品市场, 系当地渔民捕自东海海区。清洗黄鳍东方鲀体表黏液后, 放在消毒后白色瓷托盘内, 用剪刀剪开腹腔, 查找和观察各组织线虫寄生情况, 然后用镊子夹出线虫, 用生理盐水冲洗去除黏附于虫体的组织碎片及黏稠物, 放入 2 mL 离心管中, 并用 75% 乙醇脱水保存, 固定备用。

收稿日期: 2019-05-08 修回日期: 2019-10-01

基金项目: 国家自然科学基金(31872546)

作者简介: 毛 婕(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类生物学。E-mail: maojie@tongji.edu.cn

通信作者: 鲍宝龙, E-mail: blbao@shou.edu.cn

1.2 黄鳍东方鲀体内寄生线虫物种鉴定

1.2.1 扫描电镜(SEM)观察

将线虫标本用 0.1 mol/L PBS 清洗 3 次,每次 20 min,2.5% 磷酸戊二醛溶液固定 3 h,0.1 mol/L PBS 清洗 3 次,每次 20 min,清洗过后采用逐级酒精脱水,30% 乙醇、50% 乙醇、70% 乙醇、90% 乙醇和无水乙醇,各级酒精梯度脱水时间为 20 min,将处理后的线虫样品置于超净工作台干燥过夜,接着利用导电胶将线虫样品固定在扫描电镜样品台,喷金之后扫描电镜观察,加速电压 6 kV^[12]。

1.2.2 分子鉴定线虫物种

选取野生黄鳍东方鲀体内的异尖线虫,将单条线虫放入 2 mL 离心管中,管中加入 500 mL 组织裂解液,加 20 μ L 的 20 mg/mL 蛋白酶 K,简短混匀后置于 56 $^{\circ}$ C 水浴锅过夜,组织裂解完全后,使用海洋动物组织 DNA 提取试剂盒(天根)提取线虫 DNA。线虫线粒体基因引物序列,上游线虫 CO I 引物为 TTCTCCACCAACCACAARGAYATY GG,下游线虫 CO I 引物为 CACCTCAGGGTGTCCGAARAAAY CARAA,引物设计参照文献[13]。PCR 总体积为 50 μ L,2 \times Taq PCR Mix 25 μ L,模板 DNA 2.5 μ L,上下游引物各 2.5 μ L,无菌水 17.5 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min;保持 4 $^{\circ}$ C。配制 1% 琼脂糖凝胶,电泳检测,切割纯化 700 bp 条带送生工生物有限公司测序,序列在 NCBI 上使用 Blast 比对,相似性高于 95% 以上物种。从 GenBank 下载 8 种线虫的 CO I 序列,与本实验获得的线虫序列进行种系发育分析。

1.3 黄鳍东方鲀体内寄生线虫 TTX 检测

1.3.1 免疫组织检测

经过 4% PFA 过夜固定的线虫,通过 70% 乙

醇,80% 乙醇、90% 乙醇和 2 次无水乙醇各 1 h 的梯度脱水后,用 lemonsol 透明组织 15 min,浸泡替换 3 次,肉眼观察组织透明情况。将透明处理后的组织放入组织包埋框,置于 65 $^{\circ}$ C 的液体石蜡中浸蜡 2 h,再换包埋框浸蜡 2 h,组织包埋好后,切片 6 μ m,37 $^{\circ}$ C 烘干过夜,脱蜡切片与抗 TTX 多克隆抗体 (Anti-Tetrodotoxin polyclonal antibody DPAB-DC4815, CD Creative Diagnostics) 一起孵育^[14],然后与荧光标记的二抗 (Goat Anti-Rabbit IgG polyclonal antibody. Alexa Fluor 488) 标记绿色荧光,使用共聚焦显微镜 (Confocal Laser Scanning Microscope) 观察拍照。

1.3.2 高效液相-质谱联用检测

分别取 2 g 线虫或 5 g 黄鳍东方鲀组织,加入 10 mL 的 0.1% 乙酸溶液提取 TTX,用水浴锅煮沸 10 min 后,冷却至室温后,配平离心管,在 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,使用旋蒸仪将上清液浓缩定容至 10 mL^[15]。加 1 mL 旋蒸液到超滤管中,4 000 r/min 离心 30 min,取出过滤液用注射器过 0.22 μ m 滤膜后,移 150 μ L 过滤液至液相小瓶内的中心小管,收集的提取液用于 LC-MS/MS 检测^[16]。

2 结果

2.1 黄鳍东方鲀组织内线虫感染情况

对 2018 年 1 月至 2018 年 12 月每月中旬采集的野生黄鳍东方鲀体内异尖线虫感染情况做周年调查,每月都有发现异尖线虫感染情况,其中 55 尾检出有异尖线虫,检出率为 19%,11 月是异尖线虫感染的高发期,感染率可达到 33%,感染最严重黄鳍东方鲀体内寄生了 105 条异尖线虫,见表 1。

表 1 2018 年东海区黄鳍东方鲀体内线虫感染情况统计表
Tab. 1 Statistics on the infection of *Anisakis* in *T. xanthopterus* of the East China Sea in 2018

样本材料 Sample material	1月 Jan	2月 Feb	3月 Mar	4月 Apr	5月 May	6月 Jun	7月 July	8月 Aug	9月 Sep	10月 Oct	11月 Nov	12月 Dec
黄鳍东方鲀 <i>T. xanthopterus</i> collection/尾	18	23	17	36	22	20	15	28	21	21	30	32
感染线虫的黄鳍东方鲀 <i>T. xanthopterus</i> infection /尾	3	4	3	7	5	6	3	4	1	2	10	7
异尖线虫 <i>Anisakis</i> /条	6	10	9	12	10	6	15	13	2	13	135	22
线虫每月感染率 Monthly infection rate of <i>Anisakis</i> /%	17	17	17	19	23	30	20	14	4	11	33	22

异尖线虫寄生于黄鳍东方鲀肝脏 33 尾、肠道 12 尾、卵巢 6 尾、精巢 4 尾。黄鳍东方鲀感染最高的组织是肝脏,在 55 尾被异尖线虫感染的黄鳍东方鲀中,肝脏感染了 33 尾,构成比为 60%,见表 2。黄鳍东方鲀肝脏、肠道、精巢内寄

生较多异尖线虫,卵巢较少,心脏、肾脏、鱼鳃和胃部等异尖线虫感染率则为零。各组织平均异尖线虫感染强度为肠道感染 3 条、肝脏感染 3 条、卵巢感染 1 条、精巢感染 28 条。

表 2 异尖线虫感染部位及感染强度
Tab. 2 Infected parts and infection intensity of *Anisakis* spp

黄鳍东方鲀组织 Tissue of <i>T. xanthopterus</i>	构成比 Composition ratio/%	平均感染强度 Average infection intensity/条	范围 Rsnge/条
肠系膜 Mesenteric	21.82	3	1~5
肝脏 Liver	60.00	3	1~6
卵巢 Ovary	10.91	1	1
精巢 Testis	7.27	28	1~105

黄鳍东方鲀感染异尖线虫的症状,表现为明显的弥漫性肠系膜增厚,主要为黏膜下水肿,厚度达 1.8 mm,并伴有肠壁腹水(图版 I-2),异尖线虫聚集贯穿于精巢组织内部和存活于卵巢组织膜外(图版 I-4),对比肝脏检查结果,可见肝脏组织黏膜下水肿突出的褶皱,轻微的腹围脂肪胶合(图版 I-6)。

2.2 黄鳍东方鲀体内寄生线虫物种鉴定

2.2.1 线虫外部形态结构

线虫形态特征为静态卷曲(图版 II-1),虫体粗壮,体色透明,活体时做波浪线运动,行为较为活跃。形态学观察显示线虫生殖腺没有发育,尾部比较短,只有顶端的尾突(图版 II-3,6)。异尖线虫物种鉴定取决于是否存在具有黏膜的圆形尾部(图版 II)。角质层横向横纹(图版 II-5),尾巴不规则地起皱。食道位于前部肌肉和后部腺体,在活幼虫中明显可见(图版 II-2)。虫体体壁厚且长,有角质层牙(图版 II-2)。无胃盲囊和肠盲囊,胃较大且呈圆锥形(图版 II-4)。由此可以判断本次所采集线虫标本是异尖属线虫。

2.2.2 黄鳍东方鲀体内寄生线虫的分子鉴定

野生黄鳍东方鲀寄生线虫从外形上看为同一种线虫,随机提取 10 条线虫的 DNA 进行扩增 *CO I* 测序分析。将扩增产物经 BLAST 在线比对,10 条与派氏异尖线虫 *CO I* 基因(登录号为 LC222461.1)同源率为 95%~98%。GenBank 数据库已公布的 8 种线虫 *CO I* 线粒体基因序列包括:典型异尖线虫、简单异尖线虫(*A. simplex*)、派氏异尖线虫、抹香鲸异尖线虫(*A. physeteris*)、盲囊线虫(*Contracaecum muraenesoxi*)、内弯宫脂线虫(*Hysterothylacium aduncum*)、带鱼针晶蛔线虫

(*Raphidascaris trichiurid*) 和小抹香鲸异尖线虫(*A. paggiae*)。利用 *CO I* 序列数据和参考物种的序列通过 MEGA6 软件采用 NJ 法构建系统进化树,黄鳍东方鲀组织内寄生线虫 S1~S10 基因序列结果见图 1,同派氏异尖线虫 *CO I* 基因的亲缘关系较近。

2.3 线虫体内 TTX 检测

2.3.1 线虫 TTX 免疫原位表达

使用 TTX 特异性单克隆抗体,将标记特异性绿色荧光信号用于免疫组化检测,发现 TTX 在整个线虫几乎都有分布,最主要分布在异尖线虫体壁,体腔中的 TTX 主要在胚层之间(图版 III)。

2.3.2 线虫体内 TTX 高效液相-质谱联用

根据 LC-MS/MS 检测结果,在正电喷雾模式下,样品在 MRM 模式下检测碎片离子为 320.1/162.0。线虫样品有与标准品 TTX 相同的出峰时间为 1.99 min。根据不同浓度 1 ng/mL TTX、10 ng/mL TTX、25 ng/mL TTX、50 ng/mL TTX、100 ng/mL TTX 得出河鲀毒素标准品曲线,TTX 的标准曲线为 $Y = 782X - 8.26$ (图 2a 和 b), R^2 值为 0.9967,在 100 ng/mL 的浓度范围内对 TTX 的对数浓度显示出良好的线性。异尖线虫河鲀毒素含量为 425 ng/g(图 2c)。根据标准品的出峰时间,在 302 离子峰和 161 离子碎片的峰图确定河鲀毒素。野生黄鳍东方鲀肝脏中的 TTX 浓度测定为 1707 ng/g(图 2d)、肠道中的 TTX 浓度为 29 ng/g、精巢中的 TTX 浓度为 22 ng/g、卵巢中的 TTX 浓度为 5270 ng/g。异尖线虫寄生在野生黄鳍东方鲀组织内的 TTX 含量高于黄鳍东方鲀肠道和精巢中 TTX 含量。

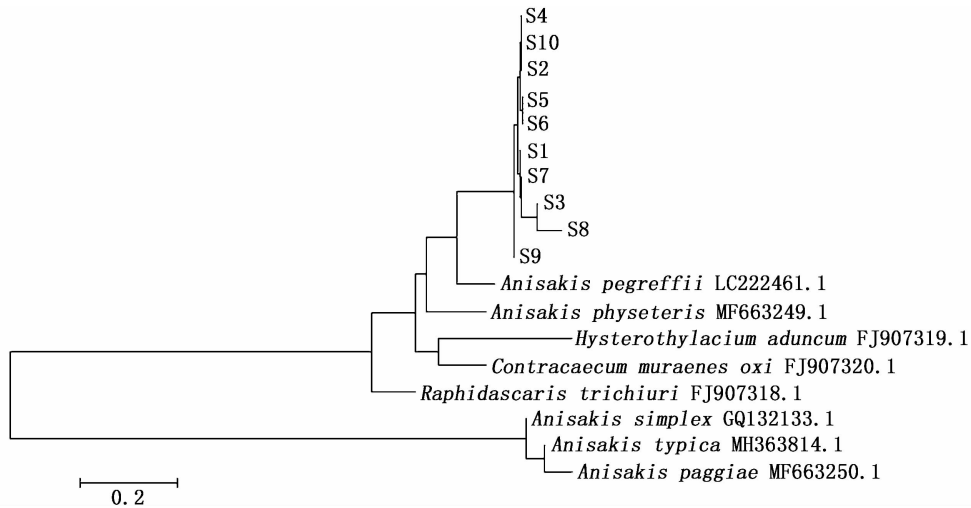


图 1 黄鳍东方鲀体内寄生线虫 CO I 基因的聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of CO I gene sequences of *Anisakis* spp in *T. xanthopterus*

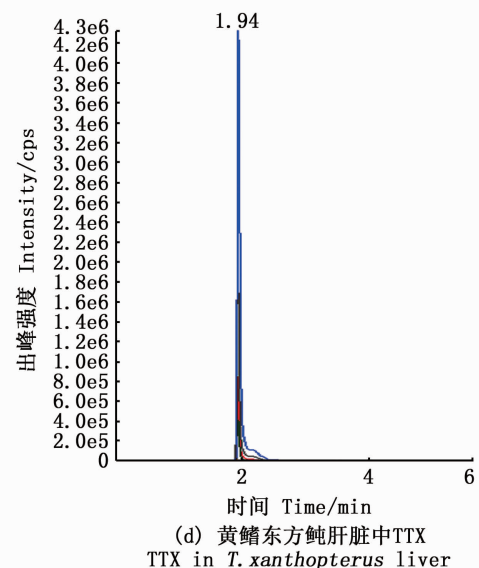
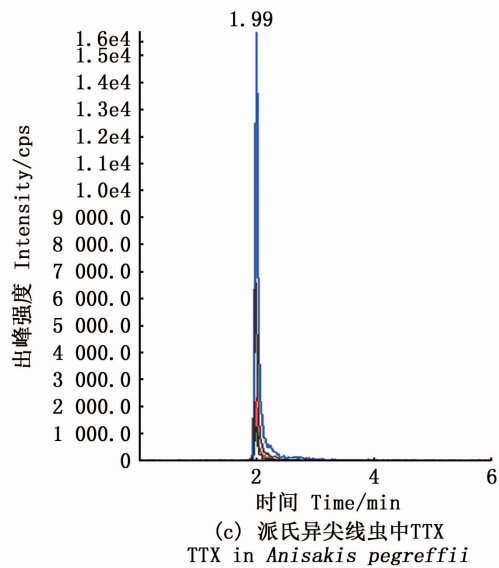
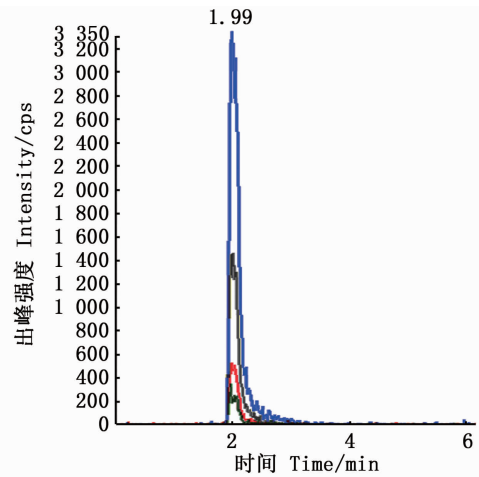
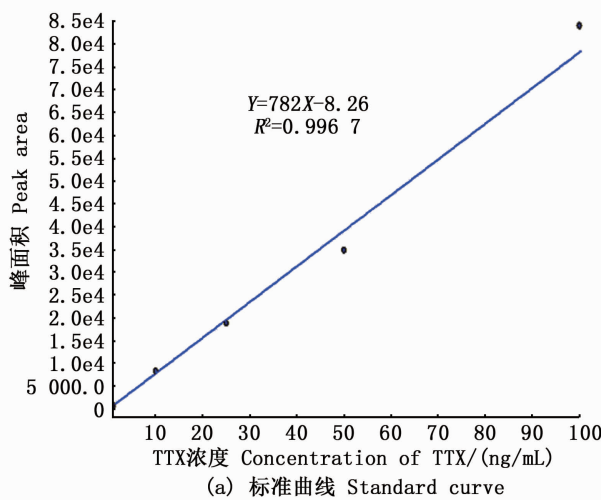


图 2 LC-MS/MS 检测异尖线虫和黄鳍东方鲀肝脏中 TTX 图谱

Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms of samples from *Anisakis* spp and from liver of *T. xanthopterus*

3 讨论

3.1 黄鳍东方鲀寄生异尖线虫感染情况分析

经统计发现,在东海区黄鳍东方鲀体内共计采集到 253 条派氏异尖线虫。在所调查的 283 尾黄鳍东方鲀中,各季黄鳍东方鲀异尖线虫感染率的差异较大,冬季黄鳍东方鲀的感染率较高,感染强度最高的是在 11 月份,雄性黄鳍东方鲀体内共检出 105 条派氏异尖线虫。异尖线虫广泛寄生在海洋经济鱼类如凤尾鱼 (*Engraulis encrasicolus*)、澳洲鲭 (*Sarda sarda*)、沙丁鱼 (*Sardina pilchardus*) 和大西洋竹荚鱼 (*Trachurus trachurus*)^[17]。海洋鱼类感染异尖线虫报道中异尖线虫病与吃生鱼片密切相关。严重时可引发消化道出血、溃烂、肠壁增厚、肠阻塞甚至肠坏死^[18]。本研究发现派氏异尖线虫在肠系膜、卵巢、精巢和肝脏寄生,而在肌肉组织中没有发现寄生的派氏异尖线虫,食用黄鳍东方鲀鱼肉也相对不容易引起异尖线虫的感染。

3.2 黄鳍东方鲀组织内分离的线虫物种鉴定

异尖线虫物种鉴定取决于是否存在具有黏膜的圆形尾部^[19]。本文异尖线虫形态有角质层牙和横向横纹,尾巴不规则地起皱,食道的漏斗形特征也符合文献中异尖线虫形态学分类描述^[20]。利用形态和分子相结合的方法,已在几种鱼类中开展了寄生异尖线虫的鉴定,鉴定出厦门宫脂线虫 (*Hysterothylacium amoyense*)、带鱼针蛔线虫 (*Raphidsascaris trichiuri*)^[21]。本研究对从黄鳍东方鲀体内分离的线虫 DNA 测序结果经比对和聚类分析后,发现其与派氏异尖线虫最为接近,结合形态特征,可以确定所分离的线虫为派氏异尖线虫。已有报道派氏异尖线虫分布在日本海到东海的鱼类中,东海区黄鳍东方鲀感染的优势种即为派氏异尖线虫^[3]。

3.3 黄鳍东方鲀寄生线虫含河鲀毒素

本研究所采集的东海区野生黄鳍东方鲀,其体内寄生的派氏异尖线虫通过质谱和免疫组化检测,发现含有河鲀毒素。高效液相-质谱方法是目前检测河鲀毒素最可靠方法^[22],荧光免疫组化显示,TTX 在派氏异尖线虫各部位均有分布,在线虫肌肉细胞分布最多,这是首次发现派氏异尖线虫体内具有 TTX。派氏异尖线虫体内的 TTX 含量达到 425 ng/g,虽然低于黄鳍东方鲀肝脏和

卵巢中 TTX 含量,却超过肠道和精巢中的 TTX 含量,表明派氏异尖线虫具有累积 TTX 的能力,而且派氏异尖线虫能寄生在黄鳍东方鲀 TTX 含量很高的肝脏和卵巢组织中,表明派氏异尖线虫具有很强的耐受 TTX 的能力。目前只有报道线虫、吸虫、绦虫、山口绦刺鱼蚤和河鲀拟鱼虱等少数几种寄生生物含有 TTX^[10-11]。派氏异尖线虫耐受 TTX 的机制,需要今后进一步研究。

综上所述,本研究首次发现东海区野生黄鳍东方鲀组织内寄生的派氏异尖线虫含 TTX,表明派氏异尖线虫具有耐受 TTX 的能力。

参考文献:

- [1] GUARDONE L, NUCERA D, ROSELLINI N, et al. Occurrence, distribution and viability of *Anisakis* spp. larvae in various kind of marketed herring products in Italy[J]. Food Control, 2019, 101: 126-133.
- [2] CABRERA-GIL S, DESHMUKH A, CERVERA-ESTEVAN C, et al. *Anisakis* infections in lantern fish (*Myctophidae*) from the Arabian Sea; a dual role for lantern fish in the life cycle of *Anisakis brevispiculata*[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2018, 141: 43-50.
- [3] QUIAZON K M A, YOSHINAGA T, OGAWA K. Distribution of *Anisakis* species larvae from fishes of the Japanese waters [J]. Parasitology International, 2011, 60(2): 223-226.
- [4] 史梅青,明珠,张莉,等. 中国渤海鱼类寄生异尖属线虫幼虫的分子鉴定和遗传多样性分析(线虫纲,蛔总科)[J]. 动物分类学报, 2013, 38(4): 687-694.
SHI M Q, MING Z, ZHANG L, et al. Molecular identification and genetic diversity of *Anisakis* larvae (Nematode, Ascaridoidea) from marine fishes in the Bohai Sea, China[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2013, 38(4): 687-694.
- [5] 周晶耀,林启,张辉,等. 舟山渔场海洋鱼类异尖线虫感染调查及分子鉴定[J]. 预防医学, 2017, 29(7): 694-697, 701.
ZHOU J Y, LIN Q, ZHANG H, et al. Investigation and molecular identification of *Anisakis* infection in marine fishes in Zhoushan fishing ground[J]. Preventive Medicine, 2017, 29(7): 694-697, 701.
- [6] 阮廷清. 我国大陆沿海海鱼感染异尖线虫调查数据统计分析[J]. 中国热带医学, 2007, 7(7): 1223-1225.
RUAN T Q. Survey of *Anisakis* in seawater fish in coast areas of China and data analysis [J]. China Tropical Medicine, 2007, 7(7): 1223-1225.
- [7] 马宏伟,姜泰京,全福实,等. 图们江夏型大麻哈鱼异尖线虫感染情况初步调查[J]. 延边医学院学报, 1993, 16(1): 29-32.
MA H W, JIANG T J, QUAN F S, et al. The primary

- investigation of *Anisakis* larvae in *Oncorhynchus Keta* of tumenjiang [J]. Journal of Medical Science Yanbian University, 1993, 16(1): 29-32.
- [8] KIM H, BAEK K W, PARK M K, et al. Establishment and validation of ARMS (Amplification-Refractory Mutation System) for identification of *Anisakis* species collected from Korean waters[J]. Gene, 2019, 691: 125-131.
- [9] LALCHANDANI U R, WEADOCK W J, BRADY G F, et al. Imaging in gastric anisakiasis [J]. Clinical Imaging, 2018, 50: 286-288.
- [10] MEBS D, YOTSU-YAMASHITA M, SEITZ H M, et al. Tetrodotoxin does not protect red-spotted newts, *Notophthalmus viridescens*, from intestinal parasites [J]. Toxicon, 2012, 60(1): 66-69.
- [11] ITO K, OKABE S, ASAKAWA M, et al. Detection of tetrodotoxin (TTX) from two copepods infecting the grass puffer *Takifugu niphobles*: TTX attracting the parasites? [J]. Toxicon, 2006, 48(6): 620-626.
- [12] 明珠. 野生哺乳动物寄生线虫的分类学和派氏异尖线虫群体遗传结构分析[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2010.
- MING Z. Taxonomy of parasitic nematodes from some wild mammals and population genetic structure analysis of *Anisakis pegreffii*[D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2010.
- [13] CARMILLERI G, COSTA A, GRACI S, et al. Presence of *Anisakis pegreffii* in farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) commercialized in Southern Italy: a first report [J]. Veterinary Parasitology, 2018, 259: 13-16.
- [14] ITOI S, YOSHIKAWA S, TATSUNO R, et al. Difference in the localization of tetrodotoxin between the female and male pufferfish *Takifugu niphobles*, during spawning[J]. Toxicon, 2012, 60(6): 1000-1004.
- [15] WEI F, MA T L, GONG X L, et al. Identification of tetrodotoxin-producing bacteria from goby *Yongeichthys criniger*[J]. Toxicon, 2015, 104: 46-51.
- [16] 张娜, 韦芬, 鲍宝龙. 星点东方鲀及共生细菌河鲀毒素的提取与检测[J]. 上海海洋大学学报, 2017, 26(6): 801-807.
- ZHANG N, WEI F, BAO B L. Extraction and detection of tetrodotoxin in *Takifugu niphobles* and its symbiotic bacteria [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2017, 26(6): 801-807.
- [17] COSTA A, CARMILLERI G, GRACI S, et al. Survey on the presence of *A. simplex* s. s. and *A. pegreffii* hybrid forms in Central-Western Mediterranean Sea [J]. Parasitology International, 2016, 65(6): 696-701.
- [18] KANG W H, KIM K S, LEE S H, et al. Gastric *Anisakis* after eating raw salmon [J]. Digestive and Liver Disease, 2019, 51(4): 602.
- [19] EISSA A E, SHOWEHDI M L, ISMAIL M M, et al. Identification and prevalence of *Anisakis pegreffii* and *A. pegreffii* × *A. Simplex* (s. s.) hybrid genotype larvae in Atlantic horse Mackerel (*Trachurus trachurus*) from some North African Mediterranean coasts [J]. The Egyptian Journal of Aquatic Research, 2018, 44(1): 21-27.
- [20] 徐国丰. 南海鳗鱼寄生异尖线虫的分子鉴定[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2012: 1-45.
- XU G F. Molecular identification of the anisakid larva from the eel in the South China Sea [D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2012: 1-45.
- [21] UMEHARA A, KAWAKAMI Y, ARAKI J, et al. Multiplex PCR for the identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes [J]. Parasitology International, 2008, 57(1): 49-53.
- [22] 马廷龙, 龚小玲, 管哲成, 等. 云斑裸颊虾虎鱼体内各组织河鲀毒素的含量[J]. 上海海洋大学学报, 2014, 23(5): 675-679.
- MA T L, GONG X L, GUAN Z C, et al. Analysis of the tetrodotoxin content of tissues in *Yongeichthys criniger* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2014, 23(5): 675-679.

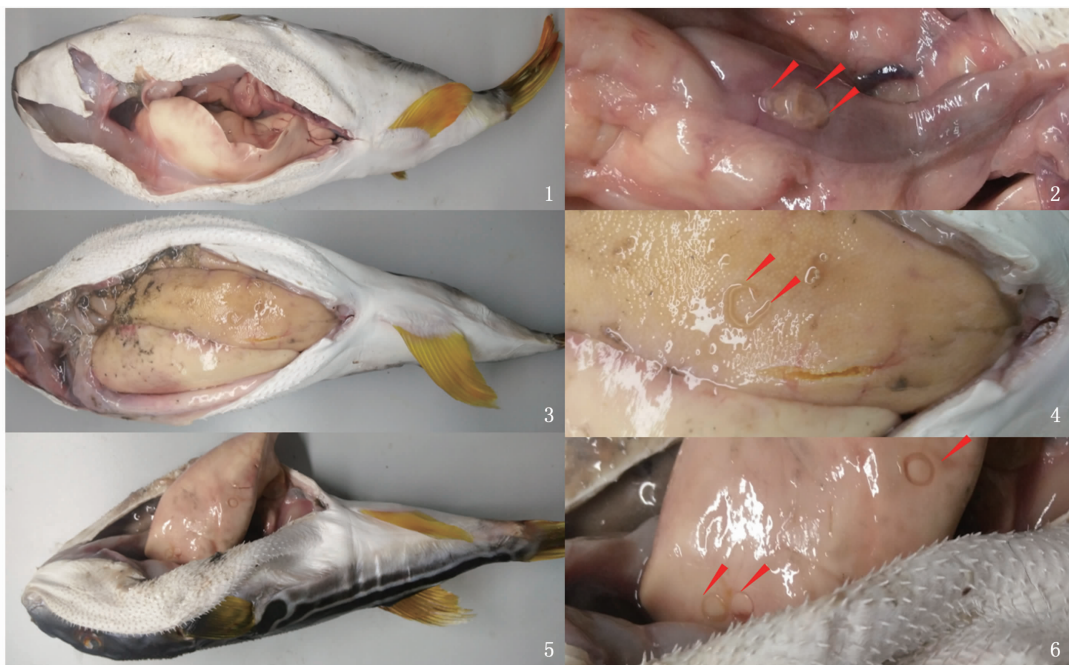
Identification of TTX *Anisakis pegreffii* parasites in *Takifugu xanthopterus* from the East China Sea

MAO Jie^{1,2}, GONG Xiaoling^{1,2}, BAO Baolong^{1,2}

(1. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: We examined 283 wild *Takifugu xanthopterus* samples from the East China Sea to investigate the infection of *Anisakis*. It was found that the infection of *Anisakis* in *T. xanthopterus* was the highest in November. In situ photographing of the infected tissue of *T. xanthopterus* showed that the highest infection rate was as high as 60% in the liver and average infection intensity in the liver is 3 anisakises per fish. Identification by mitochondrial DNA molecules and morphologic features, the parasite of *T. xanthopterus* is *Anisakis pegreffii*. LC-MS/MS showed that the content of TTX in *Anisakis* was 425 ng/g. This is the first time that an anomalous nematode parasitic in *T. xanthopterus* has been found to have a tetrodotoxin.

Key words: East China Sea; *Takifugu xanthopterus*; *Anisakis pegreffii*; parasitic; TTX

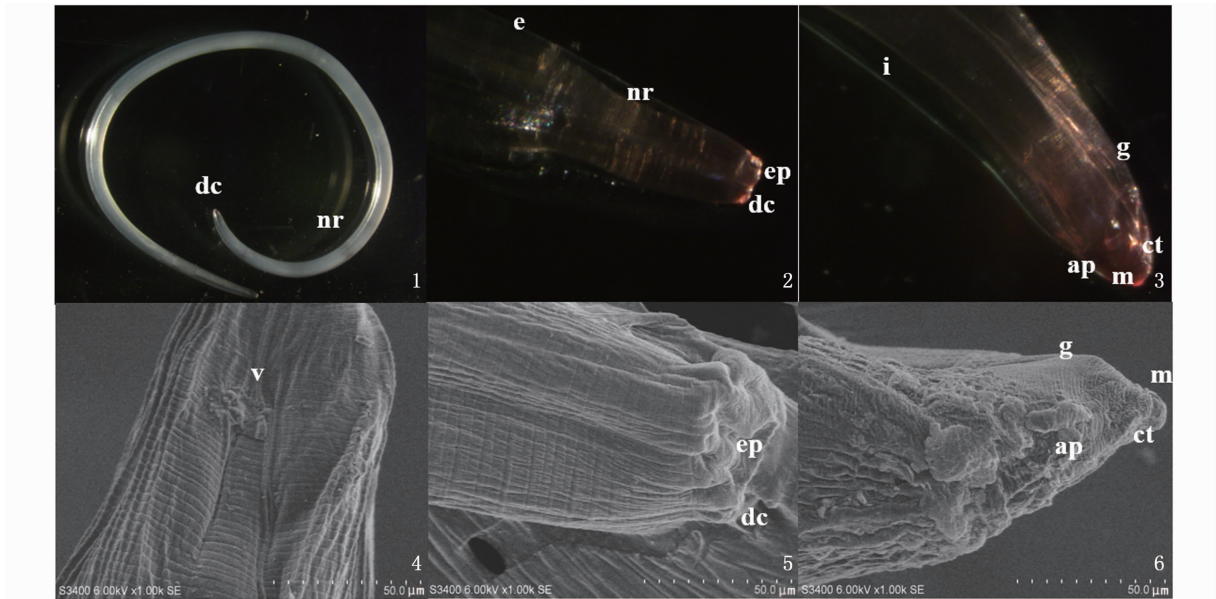


1. 异尖线虫寄生黄鳍东方鲀肠系膜; 2. 局部放大; 3. 异尖线虫寄生黄鳍东方鲀卵巢外侧; 4. 局部放大; 5. 异尖线虫寄生黄鳍东方鲀肝脏; 6. 局部放大

1. *Anisakis* in *T. xanthopterus* mesentery; 2. Partial magnification; 3. *Anisakis* in *T. xanthopterus* ovary; 4. Partial magnification; 5. *Anisakis* in *T. xanthopterus* liver; 6. Partial magnification

图版 I 黄鳍东方鲀不同组织原位感染异尖线虫情况

Plate I In situ infection of *Anisakis* spp in different tissues of *T. xanthopterus*

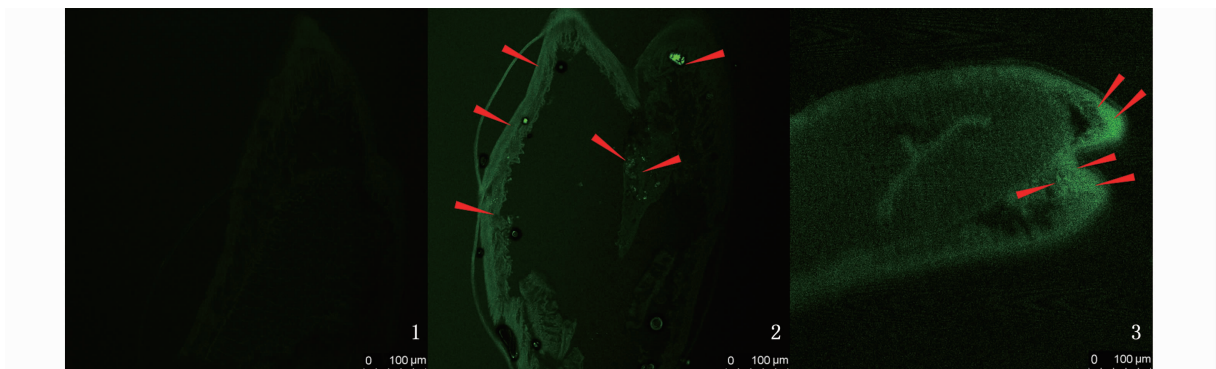


1. 线虫整体; 2. 头端; 3. 尾部; 4. 胃部; 5. 头部; 6. 尾部; dc. 角质层牙; ep. 排泄孔; nr. 神经环; e. 食管; v. 胃; i. 肠; g. 腺体; ap. 肛门; ct. 圆锥尾; m. 尾突

1. *Anisakis* overall; 2. Cephalic extremity; 3. Posterior end; 4. Stomach; 5. Cephalic extremity; 6. Posterior end; dc. Cuticular tooth; ep. Excretory pore; nr. Nerve ring; e. Esophagus; v. Ventriculus; i. Intestine; g. Glands; ap. Anal pore; ct. Conical tail; m. Mucron

图版 II 黄鳍东方鲀体内寄生线虫形态

Plate II Morphological observation of *Anisakis* spp in *T. xanthopterus*



1. 阴性对照; 2. 横切面; 3. 纵切面; 绿色为 TTX 信号. 红色箭头示信号较强区域

1. Negative control; 2. transection view; 3. longitudinal section view; Positive signal is green. Red arrows show the regions with relative high TTX

图版 III 异尖线虫 TTX 的免疫组化荧光检测

Plate III Immunostaining detection of TTX in *Anisakis* spp